

Histondeacetylase 8: Interaktionen und Lokalisation

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation

von

Dipl. Ing. (FH) Patricia Haus

aus Worms

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Harald Kolmar

Tag der Einreichung: 24.06.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2014

Darmstadt 2014

D17

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

(Patricia Haus)

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation durchführen zu dürfen. Insbesondere sein intensives Bestreben mit anderen Arbeitsgruppen vernetzt zu arbeiten, hat mir die Durchführung einer Arbeit mit diesem großen Methodenspektrum ermöglicht und darüber hinaus meine Arbeitsweise nachhaltig beeinflusst. Ich danke ihm auch, dass seine Tür für mich immer offen war. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei der Hochschule Darmstadt für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Darüber hinaus möchte ich ihm danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe immer einen Arbeitsplatz und ein offenes Ohr hatte.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Tobias Meckel und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Miriam Grunewald. Mein Dank gilt hier der intensiven Zusammenarbeit, aber auch den vielen, vielen Mikroskopiestunden.

Ich möchte mich ebenfalls für die vielen Messungen und die vielen Stunden intensiver Diskussion bei Dr. Julian Langer (MPI, Frankfurt), Dr. Ralph Bischoff (PEPper Print, Heidelberg) und Daniel Petras (TU, Berlin) bedanken. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Dr. Matthias Baud (Imperial College, London) für die Synthesen meiner Substanzen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Michael Schröder, Christian Meyners und Jan Brod für ihre Unterstützung während meiner Schwangerschaft und meiner Elternzeit bedanken. Ohne sie wäre die praktische Umsetzung letzter abschließender Experimente nicht in dieser Form möglich gewesen.

Auch möchte ich folgenden Personen für ihre Zusammenarbeit im Rahmen ihres Studiums an der Hochschule Darmstadt danken: Maximilian Schneider, Lisa Höfle, Elisabeth Gehr, Katharina Knobloch, Yannick Kopp, Nathalie Hönig, Camila Pascoal sowie Katharina Linn.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann und meiner Schwester für die vielen Stunden anregender Diskussionen und der intensiven Unterstützung bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	12
1.1	Regulation der Gentranskription	12
1.1.1	Das Chromatin	12
1.1.2	Epigenetik und Histonacetylierung	12
1.1.3	Die HDAC-Familie	13
1.1.4	Histonacetylierung in der Krebsentstehung	14
1.2	HDAC8 als Vertreter der Klasse I HDACs	15
1.2.1	Aufbau des HDAC8-Aktivzentrums	15
1.2.2	Struktureller Vergleich des HDAC8-Proteins und anderer HDAC-Isoformen	16
1.3	Die physiologische Rolle des HDAC8-Proteins	18
1.3.1	Expression von HDAC8 in Geweben und Zelllinien	18
1.3.2	Zelluläre HDAC8-Lokalisation	19
1.3.3	HDAC8-Protein-Interaktionen	20
1.4	Die Inhibition des HDAC8-Proteins	22
2	ZIEL	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien	25
3.1.2	Reagenzien, Puffer und Lösungen	26
3.1.3	Antikörper und Massenstandard	30
3.1.4	Plasmide	31
3.1.5	Kits	31
3.1.6	Substanzen	31
3.1.7	Zelllinien	31
3.1.8	Laborequipment und -gerät	32
3.2	Methoden	32
3.2.1	Zellbiologische Methoden	32
3.2.2	Biochemische Methoden	35
3.2.3	Chipentwicklung in Kooperation mit der Firma PEPperPrint	43
3.2.4	Fluoreszenzbasierte Methoden	45

3.2.5	Chemische Methoden	47
3.2.6	Rekombinante Proteinexpression	48
3.2.7	Molekularbiologische Methoden	52
3.2.8	Statistik	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Etablierung des Produktions- und Aufreinigungsverfahrens für das HDAC8-Protein	57
4.1.1	Expression des HDAC8-Proteins	57
4.1.2	Die Stabilisierung des HDAC8-Proteins zur Lagerung	71
4.2	HDAC8-Lokalisation in eukaryotischen Zelllinien	75
4.2.1	Charakterisierung der potentiellen NLS des HDAC8-Proteins	75
4.2.2	Quantitative, immunologische Bestimmung des HDAC8-Proteins in den Zelllinien Hek293 sowie K562	76
4.2.3	Fraktionierte Zelllyse und immunologischer Nachweis des HDAC8-Proteins zur Lokalisationsbestimmung	77
4.2.4	Überexpression der HDAC8 als Fusionsprotein mit GFP in Hek293-Zellen	80
4.2.5	Immunfluoreszenz-basierter Nachweis der Lokalisation von HDAC8 in Hek293-Zellen	81
4.2.6	Lokalisationsbestimmung der HDAC8 als Fusionsprotein mit dem schaltbaren Fluoreszenzprotein mEos2 in Hek293-Zellen	83
4.3	Die Identifikation von HDAC8-Interaktionen	85
4.3.1	Identifikation von HDAC8-Proteinbindungspartnern	86
4.3.2	Identifikation von HDAC8-Substraten	98
4.3.3	Die Histone H2A, H2B sowie H3 als Substrate der HDAC8	108
4.4	Identifikation von HDAC8-Inhibitoren	115
4.4.1	Screen der LOPAC-Bibliothek gegen das HDAC8-Protein	115
4.4.2	Nachweis von Fluoreszenz-löschenden Substanzen	116
4.4.3	Isoformselektivität der Substanzen	116
4.4.4	IC50-Wert-Bestimmung von Substanzen gegen das HDAC8-Protein	119
5	DISKUSSION	122
5.1	Die intrazelluläre Lokalisation des HDAC8-Proteins	122
5.2	Bindungspartner und Substrate der HDAC8	125
5.3	Rekombinante Expression des HDAC8-Proteins	129

5.4	Stabilität des HDAC8-Proteins	131
5.5	Interaktion des HDAC8-Proteins mit kleinen Molekülen	132
6	ZUSAMMENFASSUNG	136
7	ABSTRACT	137
8	LITERATURVERZEICHNIS	138
9	ANHANG	148
10	LEBENS LAUF	152

Abkürzungsverzeichnis

AcK	Acetyllysin
ACN	Acetonitril
AMC	Aminomethylcumarin
APHA	3-(4-Aroyl-1 H-2-Pyrollyl)-N-Hydroxypropenamid
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidin
Boc-Lys(TFA)-AMC	Butyloxycarbonyl-Lysin(Trifluor)-Aminomethylcumarin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Kulturschalen (Culture Dishes)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CLSM	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope)
CREB	Transcription Factor cAMP Responsive Element
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DOPE	Phosphatidylethanolamin
DOSPA	2,3-Dioleyloxy-N-[2(Spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1- propanaminium Trifluoroacetat
DTT	Dithiothreitol
DMFA	Dimethylformamid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ERR	Estrogen-Related Receptor
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histon
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDAH	Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase
HDI	Histondeacetylaseinhibitor
HDLP	Histondeacetylase-ähnliches Protein (Histone Deacetylase-like Protein)

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFO	Ameisensäure
HSP	Hitzeschockprotein (Heat Shock Protein)
IMAC	Immobilisierte Metall-Ionenaffinitätschromatographie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
KGF	Keratinocyten-Wachstumsfaktor
LB	Lysogeny broth
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
MS	Massenspektroskopie
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NAM	Nikotinamid
NBT	p-Nitroblautetrazolium-Chloride
NLS	Kernlokalisationssequenz (Nuclear Localization Sequence)
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NPC	Kernporenkomplex (Nuclear Pore Complex)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEGMA	Polyethylenglycol-Methacrylatpolymer
PKA	Proteinkinase A
PMF	Peptidmassen Fingerprinting (Peptide Mass Fingerprinting)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Proteinphosphatase
r	Korrelationsfaktor
SAHA	Suberoylanilidhydroxamsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB	Super optimal broth
TB	Terrific Broth
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
ün	über Nacht
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Regulation der Gentranskription

1.1.1 Das Chromatin

Die Organisation der DNA erfolgt in Eukaryonten über eine komplexe Anordnung von DNA, Histonen (H) sowie Nicht-Histon-Proteinen. In einem ersten Schritt wird im Nukleosom ein 146 Nukleotid-langer DNA-Strang in zweieinhalb Windungen an ein Histonoktamer, bestehend aus einem H3-H4-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren, angeordnet [Kornberg und Lorch, 1992]. Bei der weiteren Organisation als Chromatosom werden zwischen zwei Nukleosomen kurze Stücke ungebundener DNA an das Brückenprotein H1 assoziiert. Die Zusammenlagerung resultiert in der höher geordneten, kompakten Chromatinstruktur [Luger *et al.*, 1999].

Die Organisation der DNA in der Chromatinstruktur dient nicht nur der Kondensation, sondern darüber hinaus auch der Transkriptionskontrolle. Entscheidend ist hier eine freie Zugänglichkeit der DNA, sodass Transkriptionsfaktoren die Bindung möglich ist. Erst durch eine geöffnete Chromatinstruktur und deren Umstrukturierung ist die Anlagerung von Proteinen wie der RNA-Polymerase und folglich die Transkription möglich [Philipps und Shaw, 2008].

1.1.2 Epigenetik und Histonacetylierung

Die Umstrukturierung der Chromatinstruktur unterliegt der strikten Regulation. Insbesondere epigenetische Modifikation wie Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung oder Acetylierung der Histone H3 und H4 sind hier posttranslationale Regulationselemente der Transkription [Shiio & Eisenman, 2003; Hansen *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 2000; Thorne *et al.*, 1990]. Die Zelle ist in der Lage diese durch äußere Einflüsse oder durch Zelldifferenzierung erworbenen Veränderungen mitotisch und meiotisch zu vererben [Egger *et al.*, 2004].

Neben der Methylierung hat sich der Acetylierungszustand N-terminaler Bereiche der Histone als essentielles Regulationselement herausgestellt. Die positive Ladung eines Lysinrestes interagiert mit den negativen Ladungen der DNA-Phosphatgruppen resultierend in einer kompakten Struktur (siehe Abbildung 1). Eine gesteigerte Deacetylierung führt folglich zur Stilllegung bestimmter Genabschnitte, da die Anlagerung von Transkriptionselementen behindert ist. Durch die Regulation des Acetylierungszustandes einzelner Chromatinbereiche ist es so trotz gleicher Erbinformation möglich, die Genexpression gezielt zu steuern [Eberhart und Becker, 2002]. Das Regulationselement ist hier hoch selektiv und beeinflusst insbesondere Tumorsuppressorgene [Van Lint *et al.*, 2002]. Die beiden antagonistischen Enzyme Histonacetyltransferase (HAT) und Histondeacetylase (HDAC) katalysieren die

Acetylierung bzw. die Deacetylierung der ϵ -Aminogruppen evolutionär hochkonservierter Lysinreste [Eberhart und Becker, 2002].

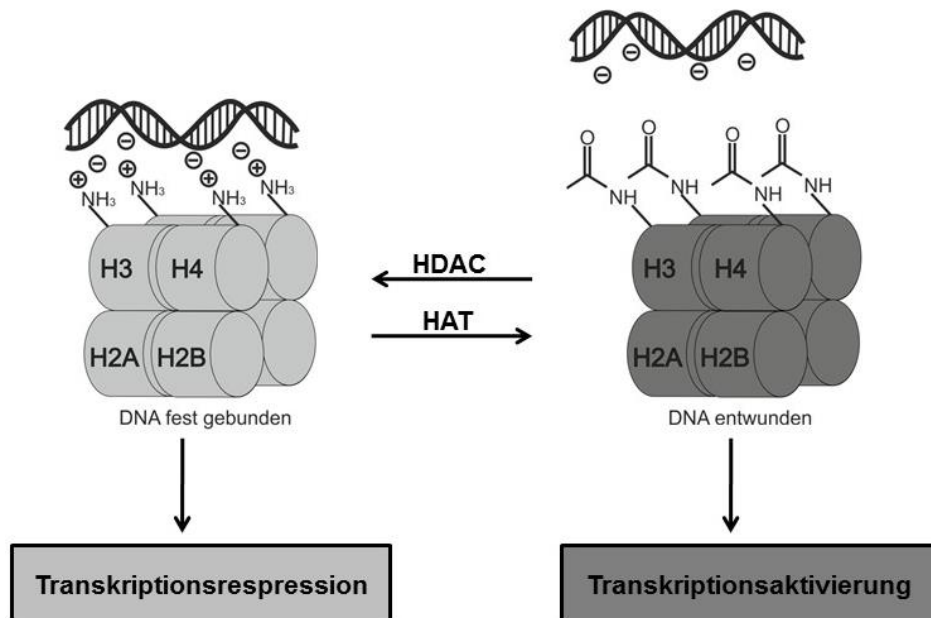


Abbildung 1: Chromatinstruktur und Transkriptionsregulation.

Histondeacetylasen (HDACs) katalysieren die Deacetylierung primärer Aminofunktionen von Histonen resultierend in einer fest gebundenen DNA und einer damit einhergehenden Transkriptionsrepression. Das antagonistische Enzym Histonacetyltransferase (HAT) führt zur Transkriptionsaktivierung (entnommen und verändert nach Imre, 2007).

1.1.3 Die HDAC-Familie

Die HDAC-Familie gliedert sich in die Klasse der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH)-abhängigen Sirtuine und die drei Zink-abhängigen Klassen der HDACs. HDAC1, HDAC2, HDAC3 sowie HDAC8 besitzen eine Sequenzverwandschaft zum Transkriptionsregulator RPD3 aus der Hefe und bilden die Klasse I der HDACs. Die HDA1-Homologe HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 sowie HDAC10 werden zur Klasse II gezählt. Auf Grund fehlender Sequenzhomologien zu anderen HDAC-Isoformen bildet HDAC11 alleinständig die Klasse 4 [de Ruijter *et al.*, 2003].

Die Funktionalität der HDAC-Isoformen erstreckt sich auf ein weites Aufgabengebiet. So sind insbesondere HDAC1 und HDAC2 in den Komplexen sin3, NuRD sowie Co-REST an der Transkriptionsregulation beteiligt. Andere Isoformen sind hingegen an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt. Die Arbeitsgruppe um Joshi *et al.* (2013) hat ein umfassendes Interaktions-Netzwerk der HDAC-Familie ausgearbeitet, welches in Abbildung 2 dargestellt ist.

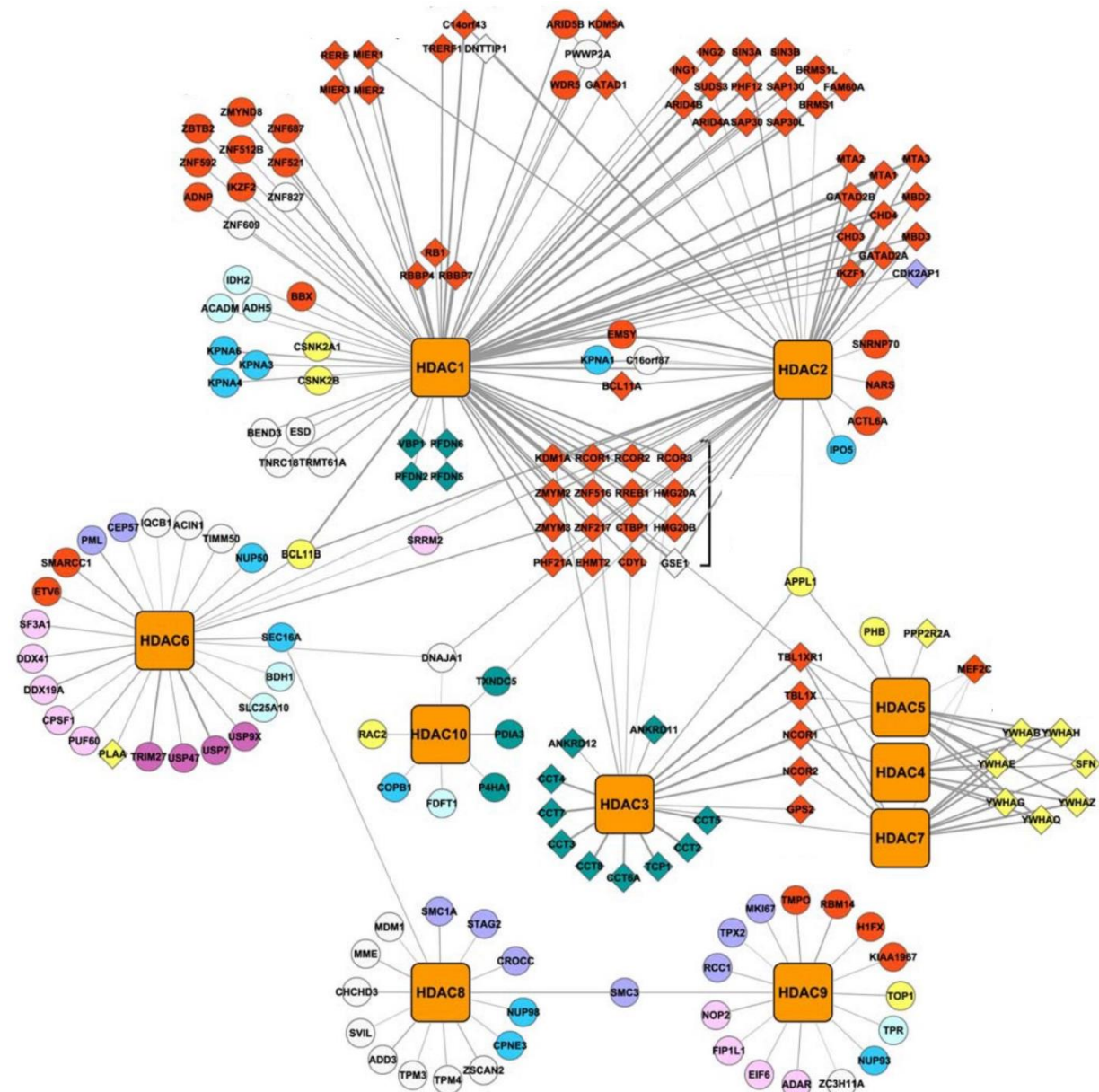


Abbildung 2: Interaktions-Netzwerk der HDAC-Familie (entnommen und verändert nach Joshi et al., 2013).

● Chromatin, Genexpression, ● Zellzyklus, ● RNA-Prozessierung, ● Ubiquitylierung, ● Signaltransduktion, ● Protein- und Ionentransport, ● Proteinfaltung und Redox, ● Metabolismus, ○ andere

1.1.4 Histonacetylierung in der Krebsentstehung

Das weite Substratspektrum der HDAC-Familie verdeutlicht deren physiologische Bedeutung. Eine Korrelation der Expressionsrate einzelner HDAC-Isoformen in gesunden und onkologischen Gewebe weist eine deutliche Erhöhung in diesem Krankheitsbild auf. Die damit einhergehende Störung des Gleichgewichtes kann in einer fehlerhaften Genexpression resultieren. Ein grundlegendes Merkmal einer Tumorzelle ist deren Entartung. Darunter wird eine Vielzahl an Veränderungen zusammengefasst, jedoch kann sie insbesondere auf die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen zurückgeführt werden. Ihnen unterliegen die Kontrolle

des Zellwachstums und der Apoptose. So werden Wachstumsfaktoren gehemmt, die Arretierung des Zellzyklus an wichtigen Kontrollpunkten zur Selbstkontrolle eingeleitet, die Apoptose bei Schäden initialisiert oder die Zelladhäsion zur Verhinderung einer Streuung kontrolliert. Eine Stilllegung dieser Proteine kann zum unkontrollierten Zellwachstum führen [Van Lint *et al.*, 2002].

Die Familie der HDACs hat sich hier als interessante Strategie bei der Tumorbehandlung herausgestellt. So führte die gezielte HDAC-Inhibierung nach Genexpressionsanalysen zu einer Beeinflussung von ca. vier bis zwölf Prozent der Gene. Zu diesen zählten insbesondere die Tumorsuppressorgene. Die Behandlung von Tumorzelllinien mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDIs) resultierte oftmals im G1-Zellzyklusarrest sowie einer Zelldifferenzierung. Damit einhergehend kam es u.a. zur Transkriptionsaktivierung des Cyclin-abhängige Kinase (CDK)-Inhibitors p21. CDKs regulieren den Fortgang des Zellzyklus, indem sie beteiligte Enzyme durch Phosphorylierung aktivieren. Die Hemmung der CDKs führt zur Stilllegung des Zellzyklus und in Folge dessen wird das Tumorwachstum durch die Einleitung der extrinsischen oder der intrinsischen Apoptose gehemmt. Unterliegen diese CDKs einer fehlerhaften Regulation kommt es zu einem unkontrollierten Zellzyklus und die Zelle ist nicht mehr zur Selbstkontrolle in der Lage, was nach einer Fehlerakkumulation zur Krebsentstehung beiträgt [Van Lint *et al.*, 2002; Johnston und Licht, 2003].

1.2 Die HDAC8 als Vertreter der Klasse I HDACs

Die HDAC8 als Vertreter der Klasse I HDACs weist mit 34% die größte Sequenzhomologie zur HDAC3 auf. Mit einer Länge von 377 Aminosäuren und einer molaren Masse von 42 kDA besitzt HDAC8 einen verkürzten C-terminalen Bereich [Buggy *et al.*, 2000]. Das HDAC8-Protein besteht aus einer einfachen α/β -Domäne, die aus acht parallelen β -Faltblatt-Strukturen, eingeschlossen zwischen 13 α -Helices, aufgebaut ist (siehe Abbildung 3C) [Somoza *et al.*, 2004].

1.2.1 Aufbau des HDAC8-Aktivzentrums

Das Aktivzentrum stellt innerhalb der HDAC-Familie einen hochkonservierten Bereich dar. Insbesondere die Unterschiede im Aufbau resultieren in einer unterschiedlichen Substraterkennung. So wird die Substratbindeoberfläche des HDAC8-Proteins aus neun Schleifen und einem 11 Å großen Aktivzentrum gebildet. Ein Vergleich der Kristallstrukturen mit gebundenem TSA (Trichostatin A) bzw. APHA (3-(4-Aroyl-1 H-2-Pyrollyl)-N-Hydroxypropenamid) zeigt die größte Flexibilität in den beiden Schleifen L1 und L2. Eine essentielle Rolle spielt die Schleife L2 bei der Inhibitorerkennung, was ebenfalls eine Funktion in der Substraterkennung nahelegt [Dowling *et al.*, 2008]. Einhergehend mit der Substratselektivität einzelner HDAC-Isoformen zeigt auch die das Aktivzentrum flankierende

L3 einen deutlichen Ladungsunterschied zu anderen Vertretern der Klasse I HDACs [Wolfson, Pitcairn und Fierke, 2012].

An die Substratbindeoberfläche schließt sich das Aktivzentrum an, welches aus einem schmalen Kanal und einer Tasche besteht. Der hydrophobe Tunnel wird von den Aminosäuren F152, F208, H180, G151, M274 und Y306 gebildet, wobei die Aminosäuren innerhalb der Klasse I mit Ausnahme von M274 konserviert sind (siehe Abbildung 3B). Das Zink-Ion ist über die Aminosäuren A178, H180 und A267 komplexiert. Das Substrat bindet an das Zink-Ion und darüber hinaus an die Aminosäuren H142, H143 sowie Y-306. Die Bindung wird durch eine Interaktion des Alkylrests des Lysins mit der Kanalwand begünstigt [Somoza *et al.*, 2004, Vannini *et al.*, 2004].

Gantt *et al.* (2006) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Aktivität der HDAC8 stark vom gebundenen Kation abhängt. So ist nicht die ursprünglich postulierte Form mit Zink als gebundenem Ion die aktivste, sondern Kobalt-substituiertes HDAC8, gefolgt von Eisen, Zink- und Nickel-substituiertem. Die Daten legen nahe, dass es sich bei der Eisen-gebundenen Variante um die physiologisch relevante handelt. Ein klarer Nachweis konnte bisher jedoch nicht erfolgen. Auch weitere Ionen wie Natrium sind von Bedeutung [Fierke *et al.*, 2006].

Im Aktivzentrum findet die Deacetylierung des Lysinrestes statt. Basierend auf strukturellen Untersuchungen des Proteins HDLP wurde zunächst ein Säure-Base-Katalysemechanismus für die Deacetylierung postuliert. Hier dient ein einfach protoniertes H142 als generelle Base, um ein Proton des Zink-gebundenen Wasserliganden aufzunehmen und so den ersten nukleophilen Angriff zu ermöglichen. Das zweifach-protonierte H143 dient hingegen als Säure und protoniert die Abgangsgruppe. Weitergehende Untersuchungen haben jedoch für das HDAC8-Protein gezeigt, dass beide Histidine einfach-protoniert vorliegen, H143 sowohl als Base als auch als Säure dient und H142 eine stabilisierende Funktion übernimmt [Wu *et al.*, 2010].

1.2.2 Struktureller Vergleich des HDAC8-Proteins und anderer HDAC-Isoformen

Funktionelle Unterschiede zu anderen Vertretern der HDAC-Klasse I finden sich insbesondere in den ersten 34 Aminosäuren N-terminal und den letzten 30 Aminosäuren C-terminal [Buggy *et al.*, 2000]. In HDAC1, 2 sowie 3 rekrutiert diese C-terminale Domäne das Protein zu Proteinkomplexen, die ihre enzymatische Aktivität und Lokalisation beeinflussen. Dies legt nahe, dass HDAC8 ohne Proteinkomplexe vollständig funktional ist oder andere Proteinbereiche für die Rekrutierung verantwortlich sind. Auch die N-terminale Varianz führt zu einer Veränderung des Proteins. So bildet die L1-Schleife (Aminosäure 30-36) einen großen Bereich des Aktivzentrums. Im Vergleich zur HDLP (Histondeacetylase-ähnliches Protein, Histone Deacetylase-like Protein) ist diese Schleife um zwei Aminosäuren verkürzt

und die Oberflächenöffnung damit einhergehend geweitet (siehe Abbildung 3A) [Somoza *et al.*, 2004].

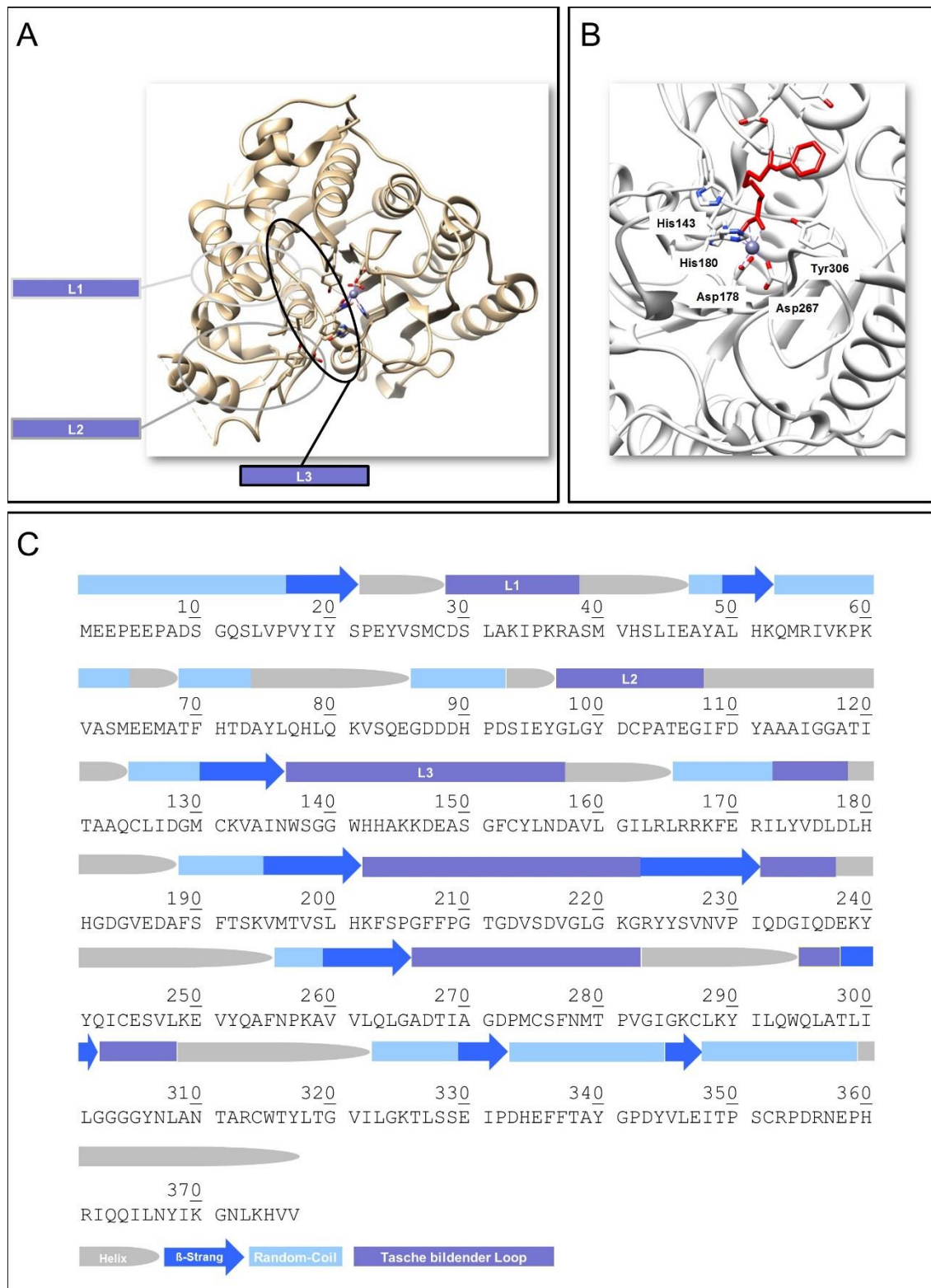


Abbildung 3: Strukturelle Darstellung der HDAC8 (1T69 nach Somoza *et al.*, 2004).

A: Strukturbestimmende Schleifen (L) der HDAC8. ● Schleife 1, ● Schleife 2, ● Schleife 3. B: Aufbau des Aktivzentrums der HDAC8 komplexiert mit SAHA (Suberoylanilidhydroxamsäure). C: Strukturelle Analyse der HDAC8-Sequenz.

1.3 Die physiologische Rolle des HDAC8-Proteins

Das humane Genom schließt ca. 30.000 Gene ein. Durch posttranslationale Modifikationen und Genspleiß-Mechanismen resultieren daraus schätzungsweise 1×10^6 Proteine, die intrazellulär in verschiedenen Kompartimenten wie dem Cytoplasma oder dem Kern vorliegen. Obwohl auch eine gewisse Anzahl dieser Proteine alleinständig funktionsfähig sind, kommt jedoch die Mehrzahl in Proteinkomplexen vor. Die Proteininteraktion resultiert oftmals in einer veränderten Funktionalität. Neben der Variation der Enzymkinetik kann die Inaktivierung sowie der Abbau eines Proteins induziert werden oder das Protein zeigt eine veränderte Affinität zu seinen Substraten. Das Zusammenspiel der einzelnen Proteine und deren Interaktion wird unter dem Begriff Interaktom zusammengefasst und ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Zelle [Sanchez *et al.*, 1999]. Ein erster Schritt zum Verständnis intrazellulärer Proteinfunktionen ist die Aufklärung dieses Interaktoms.

Insbesondere Untersuchungen des Acetyloms haben gezeigt, dass nicht nur Histone dem Regulationselement der Acetylierung unterliegen, sondern eine Vielzahl an weiteren Proteinen. Es konnten über 3600 humane Acetylierungsstellen auf Proteinen mit wichtiger zellulärer Funktion nachgewiesen werden, die weit über die Krebsentstehung hinausgehen [Choudhary *et al.*, 2009].

Prinzipiell ist zwischen stabilen und transienten Protein-Interaktionen zu unterscheiden, wobei beide Varianten sowohl stark als auch schwach ausgeprägt sein können. Die Art dieser Interaktion bedingt das Vorgehen während der Identifikation. So können insbesondere starke und stabile Interaktionen durch die Methoden Co-Immunpräzipitation (Co-IP), Co-Präzipitation bzw. Western Blot nachgewiesen werden. Transiente Interaktionen hingegen, sind schwerer zu identifizieren, da der Moment der Interaktion zunächst induziert und anschließend stabilisiert werden muss. Hierzu finden die Methoden des Quervernetzens und der gezielten Markierung Anwendung [Vidal, Cusick und Barabási, 2011].

1.3.1 HDAC8-Expression in Geweben und Zelllinien

Ist das Proteinvorkommen auf ein bestimmtes Gewebe begrenzt, spricht man von einer Gewebespezifität, woraus man eine gezielte Bedeutung für diesen Zelltyp ableiten kann. Die HDAC8-Expression zeigte eine heterologe Verteilung in allen Geweben mit einer erhöhten HDAC8-mRNA-Menge in Lebergewebe. Auch Northernblot-Analysen bestätigten eine ubiquitäre, jedoch Gewebe-spezifische Verteilung in Normalgewebe und in Krebszelllinien [Buggy *et al.*, 2000]. Des Weiteren konnte hier auch eine Vielzahl an unterschiedlichen Spleiß-Varianten identifiziert werden. So wiesen Buggy *et al.* (2000) zwei Transkripte mit einer Länge von 1,7 bzw. 0,8 kb nach, van den Wyngaert *et al.* (2000) hingegen eine hauptsächliche Spezies mit 2 kb insbesondere in Gehirn-, Nieren- und Prostatagewebe und eine zusätzliche

Bande bei 2,2 kb in Prostata-, Ovarien-, Hodengewebe sowie in den meisten Krebszelllinien. Die HDAC8-Menge war in den Krebszelllinien bis zu zehn-fach erhöht [Buggy *et al.*, 2000]. Hu *et al.* (2000) zeigten im Vergleich zur HDAC3 prinzipiell eine zehn-fach erniedrigte Expressionsrate, wobei zwei Spleiß-Varianten bei 2 und 2,4 kb nachweisbar waren. Dies lässt eine Gewebe-spezifische Funktionalität mit besonderer onkologischer Relevanz vermuten.

1.3.2 Zelluläre HDAC8-Lokalisation

Für die Funktion eines Proteins ist dessen intrazelluläre Lokalisation von entscheidender Bedeutung. Der Transport eines Proteins über die Kernmembran ist zunächst abhängig von dessen Größe. Kleine Molekül mit einer Größe von bis zu 5 kDa können die Membran über den Kernporenkomplex (NPC, Nuclear Pore Complex) frei passieren [Alberts, Johnson, Lewis, 2002]. Der Transport von größeren Molekülen findet verlangsamt statt und wird durch Kernlokalisationssequenzen (NLS, Nuclear Localization Sequence) bestehend aus hauptsächlich basischen Aminosäuren reguliert. Diese werden in den meisten Fällen von Kernimportrezeptoren erkannt, welche sowohl an die NLS als auch an die Nukleoporene binden. In vereinzelten Fällen wird die Bindung über Adapterproteine vermittelt. Die Nukleoporene weisen eine hohe Anzahl an FG (Phenylalanin, Glycin)-Motiven auf, mit deren Hilfe der Transport durch den NPC-Kanal stattfindet. Ausschließlich die Erkennung der NLS durch die Karyopherine ist durch die GTPase (Guanidintriphosphatase) Ran aktiv reguliert, der Transport an sich bleibt allerdings passiv und wird als wiederholte Assoziation und Dissoziation verstanden [Sorokin, Kim und Ovchinnikov, 2007].

Das HDAC8-Protein besitzt eine hauptsächlich basische Region zwischen Arg164 und Lys168, welche als putative NLS charakterisiert wurde [Hu *et al.*, 2000]. Aus diesem Grund wurde zunächst eine nukleäre Lokalisation postuliert. So zeigten die Arbeitsgruppen um van den Wyngaert *et al.* (2000) sowie Hu *et al.* (2000) in Immunfluoreszenzfärbungen, dass eine Überexpression des HDAC8-Proteins in Hek293-Zellen (Embryonale Nierenzelllinie, Mensch), Rat-2 (Embryonale Fibroblastenzelllinie, Ratte) sowie NIH-3T3 (Embryonale Fibroblastenzelllinie, Maus) zu einer hauptsächlich nukleären Lokalisation führte. Die Lokalisationsuntersuchungen nach einer fraktionierten Zelllyse zur Separation des Cytoplasmas und des Zellkerns wiesen hingegen ein divergentes Bild auf. So wurde für SW620-Zellen (Darmzelllinie, Mensch) eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation, für HSMC sowie SMMC (Muskelzelllinien, Mensch) und Jurkat-Zellen (T-Zelllinie, Mensch) eine hauptsächlich cytoplasmatische postuliert [Hu *et al.*, 2000; Waltregny *et al.*, 2004; Balasubramanian *et al.*, 2008]. Auch der Einfluss einer Überexpression auf die HDAC8-Lokalisationsunterschied konnte in Hek293-Zelllinien ausgeschlossen werden, da der

Vergleich vor und nach einer Überexpression eine nukleäre Lokalisation aufwies [Gao *et al.*, 2003].

1.3.3 HDAC8-Protein-Interaktionen

Auf Grund der Zugehörigkeit von HDAC8 zur Klasse I wurde zunächst von einer Histon-assoziierten Funktionalität ausgegangen. So wies die Arbeitsgruppe um Buggy *et al.* (2000) eine geringe Deacetylierbarkeit von H3 und H4 nach. Darüber hinaus konnten Hu *et al.* (2000) ebenfalls eine marginale Substrataffinität gegenüber den unspezifisch acetylierten Gesamtproteinen H2A/H2B, H3 sowie H4 detektieren. Van den Wyngaert *et al.* (2000) bestätigten dieses Ergebnis für H4 und zeigten eine gesteigerte Deacetylierungsaktivität ausschließlich gegen H4K16. Jedoch ist der tatsächliche Substratumsatz *in vivo* nicht bestätigt und für H4 fraglich. Der niedrige k_{cat}/K_M -Wert von 10^3 bis $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und der hohe K_M -Wert von $320 \text{ }\mu\text{M}$ sprechen dafür, dass H4 kein natürliches HDAC8-Substrat ist [Gant *et al.*, 2006].

Die Lokalisation des HDAC8-Proteins in verschiedenen Zellbereichen und das Vorhandensein einer hohen Anzahl flexibler Schleifen lässt auf eine promiskuitive Funktionalität schließen [Nobeli, Favia und Thornton, 2009]. Die Erkennung eines Interaktionspartners durch ein solches Protein erfolgt meist über ein Motiv. Riester *et al.* (2007) hatten hier die Reaktivität der HDAC8 zur Sequenz Ac-X-ZK(Ac) untersucht, wobei sich eine Bevorzugung der Aminosäuren P, M, A, K, R, Q, D, sowie S an der Position -2 und an Position -1 von F, W, Y (aromatische Aminosäuren) sowie I, M, V (hydrophobe Aminosäuren) zeigte. Gurard-Levin, Kim und Mrksich (2009) hingegen hatten unter Verwendung des Peptids Ac-G-X-L(Ac)-Z-G-C-NH₂ eine Präferenz für Peptide mit R und F an den Positionen X und Z postuliert. Auch die distale Sequenz konnte als entscheidend herausgestellt werden.

Eine aus hauptsächlich sauren Aminosäuren bestehende Domäne zwischen Aminosäure 83 und 95 könnte der Protein-Protein-Interaktion dienen [van den Wyngaert *et al.*, 2000]. Neben einer enzymatischen Funktion wäre auch eine Funktionalität basierend auf der reinen Bindung anderer Proteine möglich.

Einhergehend mit der cytoplasmatischen Detektion der HDAC8 in Muskelzellen und einer co-Lokalisation mit alpha-Actin [Waltregny *et al.*, 2005], Hsp20 (Hitzeschockprotein, Heat shock protein), der schweren Kette des Myosins sowie Cofilin [Karolczak-Bayatti *et al.*, 2011] kann von einer über die Histondeacetylierung hinausgehende Funktionalität ausgegangen werden. So konnte bisher eine Beeinflussung des Acetylierungsstatus des ERRA (Estrogen-Related Receptor alpha) nachgewiesen werden [Willson *et al.*, 2010]. Des Weiteren wurde die HDAC8 mit den Proteinen CREB (Transcription Factor cAMP Responsive Element) und PP1 (Proteinphosphatase 1) co-immunpräzipitiert [Gao *et al.*, 2003]. In Abbildung 4 ist ein umfassendes Interaktom des HDAC8-Proteins dargestellt.

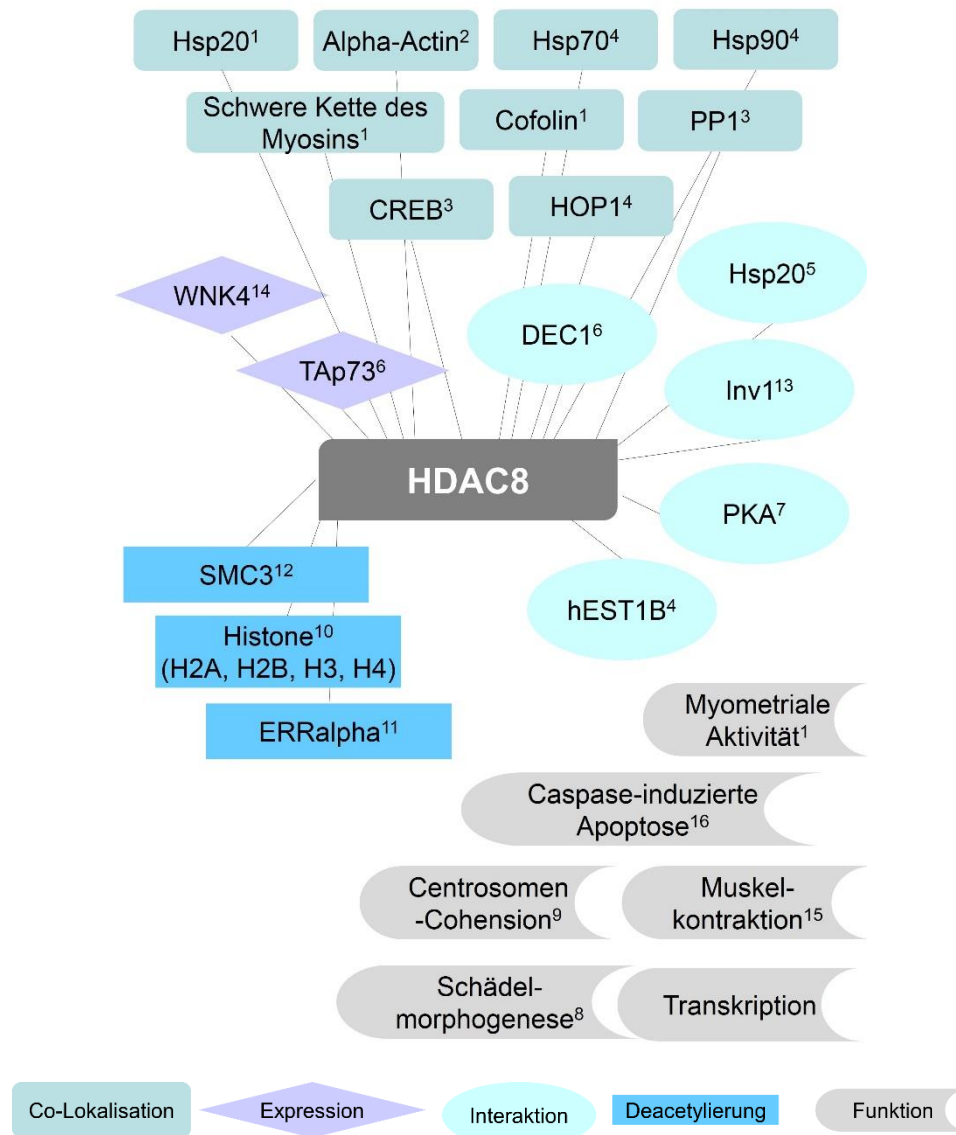


Abbildung 4: Interaktom des HDAC8-Proteins.

1 Karolczak-Bayatti *et al.*, 2011, 2 Waltregny *et al.*, 2005, 3 Gao, Siddoway und Huang, 2003, 4 Lee *et al.*, 2006, 5 Europe-Finner *et al.*, 2011, 6 Qian *et al.*, 2014, 7 Somoza *et al.*, 2004, 8 Olson *et al.*, 2009, 9 Yamauchi *et al.*, 2011, 10 Van den Wyngaert *et al.*, 2000, 11 Willson *et al.*, 2010, 12 Deardorff *et al.*, 2012, 13 Durst *et al.*, 2002, 14 Mu *et al.*, 2011, 15 KrennHrubec *et al.*, 2007, 16 Balasubramanian *et al.*, 2008

Unter Verwendung eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems nach Young, Ramm und Pabo (2000) konnten darüber hinaus 15 potentielle Bindepartner identifiziert werden. Hierzu wurde die katalytische Einheit der PKA und als Köderprotein (Bait-Protein) die HDAC8 fusioniert mit λ cl eingesetzt. Zwei dieser Interaktionen wurden genauer untersucht. Demnach resultierte der HDAC8-Knockdown in einer gesenkten Telomeraseaktivität durch eine verringerte hEST1B (human Ever-Shorter Telomeres 1B)-Menge. Des Weiteren konnte die HDAC8 mit Hop1 (Hsp70-Hsp90 Organizing Protein), Hsp70 sowie Hsp90 co-immunpräzipitiert werden. Dies legt nahe, dass diese vier Proteine einen Komplex ausbilden [Lee *et al.*, 2006].

Es wurde ebenfalls ein HDAC8-Regulationsmechanismus identifiziert. Die HDAC8-Aktivität ist durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelte Phosphorylierung der Aminosäure Ser39 beeinflusst. Die resultierende Aktivitätsminderung ist nach Somoza *et al.* (2004) in der Lage der Aminosäure begründet. Sie ist an der Proteinoberfläche ca. 20 Å von der Öffnung des Aktivzentrums bzw. 13 Å von der Öffnung der zweiten Tasche lokalisiert, wobei die Phosphorylierung vermutlich zu einer strukturellen Reorganisation des Aktivzentrums führt. Deadorff *et al.* (2012) fügte das HDAC8-Protein zum ersten Mal in einen physiologischen Kontext. Die HDAC8 fungierte demnach als eine SMC3-Deacetylase. Das Protein begünstigt die Umstrukturierung des Cohesin nach der Ablösung vom Chromatin in der Prophase sowie der Anaphase. Die Cohesin-Regulation nimmt eine große Rolle in der Entstehung des Cornelia de Lange Syndroms ein. Eine Untersuchung von 154 Patienten hatten vier *de novo* missense (sinnveränderndes Protein) Mutationen und eine nonsense (nicht funktionales Proteine) Mutation nachgewiesen. Die missense Mutationen führte zu einem HDAC8-Aktivitätsverlust. Darüber hinaus war es Oehme *et al.* (2009) möglich, eine Verbindung zwischen dem HDAC8-Protein und der Neuroblastom-Tumorgenese aufzuzeigen, was insbesondere die Bedeutung in der Onkologie herausstellt.

1.4 Die Inhibition des HDAC8-Proteins

Ein Vergleich von vier HDAC8-Kristallstrukturen, komplexiert mit den Hydroxamat-Inhibitoren TSA, MS-344, SAHA sowie CRA-A, wiesen die Varianz der Proteinoberfläche in räumlicher Nähe zur Öffnung des Aktivzentrums nach [Somoza *et al.*, 2004]. Diese Unterschiede deuten auf eine Bindungs-induziert anpassungsfähige Region hin, was im physiologischen Kontext für weitere Substrate, über Histon-Lysine hinaus, spricht. Diese Unterschiede werden hauptsächlich durch die L1-Schleife (Aminosäure S30-K36) vermittelt (siehe Abbildung 3A). Des Weiteren variiert die Lage von K33 im Aktivzentrum zwischen den einzelnen Kristallstrukturen um 6 Å. So kann sich z.B. nach der Bindung eine zweite Bindetasche ausbilden. Dies legt wiederum die Deacetylierbarkeit von Lysinresten nahe, die von großen Aminosäuren flankiert oder von anderen Aminosäuren teilweise bedeckt sind. Für HDLP konnte diese zweite Bindungstasche nicht nachgewiesen werden, was den strukturellen Unterschied hervorhebt. Die Kopfgruppe der HDI wurde zwar in allen HDAC8-Kristallstrukturen komplexiert und das Verbindungsstück geht mit der Kanalwand diverse Interaktionen ein, jedoch wird hier eine Konformationsänderung beobachtet. So liegt das Aktivzentrum nach Assoziation von SAHA als tiefe, enge Tasche, ähnlich der Kristallstruktur von HDAH oder HDLP, vor. Die Bindungs-induzierte Anpassung des Aktivzentrums spricht insbesondere für die promiskuitive Funktionalität des Proteins [Somoza *et al.*, 2004].

Die Bindung einer Substanz mit einem aromatischen Aryl-Verbindungsstück resultiert hingegen in der Ausbildung einer großen Subtasche angrenzend an M274 durch die

gegenläufige Bewegung von F152 [KrennHrubec *et al.*, 2007]. Innerhalb der HDAC-Familie stellt Methionin die einzige nicht-konservierte Aminosäure dar [Somoza *et al.*, 2004] und kann so u.a. das divergierende Bindungsverhalten erklären.

Klassische unselektive Inhibitoren wie SAHA oder TSA zeigten eine deutlich niedrigere Affinität gegenüber der HDAC8. Durch die weite Öffnung des Aktivzentrums binden Inhibitoren mit voluminösem Verbindungsstück bevorzugt an das HDAC8-Protein. Die Substanz PCI-34051 ist mit einem IC₅₀-Wert von 0,01 nM ein sehr potenter Inhibitor und weist diese Struktur auf. Der Vergleich anderer Isoformen zeigt darüber hinaus seine hohe Selektivität. Der Einsatz dieses Inhibitors resultierte jedoch ausschließlich in der T-Lymphoma-Zelllinie Jurkat in der Einleitung der Apoptose [Balasubramanian *et al.*, 2008].

2 Ziel

Das weite Funktionalitätsspektrum der Histondeacetylasen wird durch ihre Rolle in einer Vielzahl an Krankheitsbildern wie neurologischen Erkrankungen, Entzündungen oder Herzerkrankungen deutlich [Villagra, Sotomayor und Seto, 2010; Fischer *et al.*, 2010; Bush und McKinsey, 2010]. Die Zulassung der beiden HDAC-Inhibitoren Vorinostat (ZOLINZA) sowie Romidepsin (ISTODAX) zur Behandlung von kutanem T-Zell-Lymphoma zeigt darüber hinaus die besondere Bedeutung in der Onkologie [Witt *et al.*, 2008].

Das HDAC8-Protein nimmt auf Grund von multiplen Sequenzähnlichkeitsanalysen eine besondere Rolle ein [Somoza *et al.*, 2008; Whitehead *et al.*, 2011]. Einerseits gehört das Protein zur Klasse I der HDAC-Familie, andererseits weist es aber den größten Abstand zu allen anderen Mitgliedern dieser Klasse auf und steht innerhalb der Klasse I den Klasse II HDACs am nächsten [de Ruijter *et al.*, 2003]. Das HDAC8-Protein zeigt nach bisherigem, lückenhaften Kenntnisstand ein sehr ambivalentes Bild hinsichtlich seiner Funktionalität sowie seiner Lokalisation [Wolfson *et al.*, 2012].

Aus diesem Grund war es zunächst Ziel dieser Arbeit geeignete Zellmodelle zu entwickeln, mit deren Hilfe die HDAC8-Lokalisation und eine Funktionalitätsstudie durchgeführt werden kann. Dies sollte zur Klärung der widersprüchlichen Literaturlage beitragen, aber auch neue Einblicke in die HDAC8-Funktionalität bieten. Darauf aufbauend war die Identifikation von HDAC8-Bindepartnern und –Substraten zentrales Element. Zur Separation von HDAC8-Proteininteraktionen sollten klassische Methoden wie die native PAGE und die Co-Präzipitation zum Einsatz kommen. Darüber hinaus sollte auch ein angepasstes Präzipitationsverfahren etabliert werden, welches die Problematik der niedrigen intrazellulären HDAC8-Proteinmenge umgeht. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Identifikation eines Substratmotivs, wodurch sich ggf. potentielle Interaktionspartner ableiten ließen. Die Entwicklung einer Chip-basierten Affinitätsuntersuchung des HDAC8-Proteins gegenüber einer Peptidbibliothek war hier die Methode.

Des Weiteren stand die Identifikation von selektiven HDAC8-Inhibitoren im Fokus. Basierend auf der Untersuchung der LOPAC-Substanzbibliothek hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung gegen das HDAC8-Protein sollte eine Struktur-Wirkungs- bzw. Selektivitätsbeziehung bestimmt werden. Die identifizierten Substanzen sollten darüber hinaus als Werkzeuge zur Untersuchung der HDAC8-Funktionalität zum Einsatz kommen und an Trägermaterialien immobilisiert werden, um selektiv HDAC8-Komplexe aus Zell-Lysaten anzureichern. Ein interessanter Nebeneffekt wäre ggf. neue chemische Strukturen zu identifizieren, die Anhaltspunkte für die Entwicklung von Leitstrukturen für Krebswirkstoffe böten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidin (BCIP), AppliChem

AcK, Acetyllysin, synthetisiert unter Anleitung von Benjamin Horstmann, Arbeitsgruppe Meyer-Almes, Hochschule Darmstadt

Acrylamid 4K-Lösung, AppliChem

Agar-Agar (Gelstärke 820g/cm²), Otto Norwald

ε-Aminocaprinsäure, Sigma Aldrich

Ammoniumperoxodisulfat (APDS), Merck

Ammoniumsulfat, Roth

Ampicillin, Roth

Bovines Serumalbumin (BSA), Merck

Butyloxycarbonyl-Lysin(Trifluor)-Aminomethylcumarin (Boc-Lys(TFA)-AMC), Bachem

Aminomethylcumarin (AMC), Bachem

Bromphenolblau, Merck

Chloroform, Merck

4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), AppliChem

Dimethylformamid (DMFA), Roth

Dithiothreitol (DTT), AppliChem

Etylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalz-Dihydrat, AppliChem

Essigsäure, Roth

Essigsäureanhydrid, Janssen Chimica

Ethanol, Roth

Formaldehyd, AppliChem

Guanidiniumhydrochlorid, AppliChem

Glycerin, Roth

Glycin, AppliChem

Harnstoff, Merck

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), AppliChem

Isoamylalkohol, Merck

Kaliumchlorid, Roth

Kupfersulfat, Merck

Lysin, Merck

Lysogeny broth (LB)-Medium, Roth

Magermilchpulver, AppliChem

Magnesiumchloridhexahydrat, Roth
Methanol, Roth
β-Mercaptoethanol, Roth
Natriumacetat, Merck
Natriumazid, Fluka
Natriumcarbonat, Roth
Natriumchlorid, Roth
Natriumdihydrogenphosphat, Applichem
Natriumthiosulfat, Merck
Nickelchlorid (Sigma)
Nikotinamid (NAM), Fluka
Phenol, Roth
Pluronic F-68, Sigma
p-Nitroblautetrazolium-Chloride (NBT), VWR Prolabo
Salzsäure, Merck
Silbernitrat, AppliChem
Sodiumdodecylsulfat (SDS), AppliChem
Sucrose, Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED), Roth
Tris(hydroxymethyl)Aminomethan (TRIS), Roth
Triton X-100, Sigma
Trypsin, Sigma
Tween, AppliChem
Zinkchlorid, Fluka

3.1.2 Reagenzien, Puffer und Lösungen

3.1.2.1 Allgemeine Lösungen

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS): 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl (pH 7,4)

TRIS-gepufferte Salzlösung (TBST): 10 mM TRIS (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20

3.1.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

3.1.2.2.1 SDS-PAGE

Komponente	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid	5,0 ml	1,32 ml
1 M TRIS-HCl (pH 8,9)	4,5 ml	
1M TRIS-HCl (pH 6,8)	1,0 ml	
ddH ₂ O	2,2 ml	5,5 ml
20% (w/v) SDS	60 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl
12% (w/v) APDS	100 µl	100 µl

Elektrodenpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

SDS-Auflaufpuffer: 4% (v/v) SDS, 5% (v/v) Glycerin, 25% (v/v) Harnstoff, 0,01% (v/v) gesättigte Bromphenolblaulösung

3.1.2.2.2 Native PAGE

Auftragspuffer

Alpha Lactalbumin

Albumin aus Hühnereiweiß

3.1.2.3 Western Blot-Analyse

Anodenpuffer 1: 0,3 M TRIS, 10% (v/v) Methanol

Anodenpuffer 2: 25 mM TRIS, 10% (v/v) Methanol

Kathodenpuffer: 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 0,05% (v/v) SDS, 10% (v/v) Methanol

Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer: 0,1 M TRIS (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 2% (w/v)

TBS-Milch

AP-Färbelösung: 15 ml AP-Puffer, 66 µl BCIP (50 mg BCIP in 1 ml 100% DMFA), 51 µl NBT (50 mg NBT in 1 ml 70% (v/v) DMFA)

Odyssey Blocking Buffer, Li-Cor

3.1.2.4 Coomassiefärbung

Coomassieblaufärbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie blue R-250 in Entfärbelösung

Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure in 40% (v/v) Methanol

3.1.2.5 Präzipitation

3.1.2.5.1 Immunpräzipitation

Dynabeads ProteinG, Invitrogen

3.1.2.5.2 Substanz-affine Präzipitation

Sepharose/MB-669, synthetisiert von Matthias Baud, Imperial College, London

3.1.2.6 Molekularbiologie

3.1.2.6.1 Agarosegelelektrophorese

TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Laufpuffer): 40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA

DNA Loading Dye 6x (Auftragspuffer), Fermentas

Midori Green Advanced DNA Stain, Genetics

3.1.2.6.2 PCR

Taq-Polymerase (1 U/μl), Fermentas

Pfu-Polymerase (2,5 U/μl), Fermentas

Phusion DNA Polymerase, Finnzymes

10x Pfu-Puffer, Fermentas

dNTP Mix (2,5 mM), Fermentas

MgCl₂ (25 mM), Fermentas

3.1.2.6.3 Restriktion

Restriktionsenzyme (Fermentas): XhoI (10 U/μl), EcoRI (10 U/μl), XbaI (10 U/μl), HindIII (10 U/μl)

Tango Buffer 10x, Fermentas

3.1.2.6.4 Ligation

rAPid Alkaline Phosphatase (1 U/μl), Roche

T4 DNA Ligase (5 U/μl), Roche

T4 DNA Ligase (1 U/μl), Fermentas

10x T4 DNA Ligase Puffer, Fermentas

3.1.2.7 Fraktionierte Zelllyse

Puffer A: 10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT

Waschpuffer: 10 mM Hepes (pH 7,9), 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT

Puffer C: 20 mM Hepes (pH 7,9), 20% (v/v) Glycerol, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA

Puffer S1: 0,25 M Sucrose, 10 mM MgCl₂

Puffer S2: 0,35 M Sucrose, 0,5 mM MgCl₂

Zelllysepuffer (nativ): 50 mM TRIS (pH 8,5), 1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% (v/v) Triton X-100

Benzonase Nuclease (Novagen)

3.1.2.8 Aktivitätstest

FB188-Puffer: 15 mM TRIS, 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 250 mM NaCl, 0,001% (v/v) Pluronic, 0,005% (w/v) BSA

Boc-Lys(TFA)-AMC, Bachem

Boc-Lys-AMC, Bachem

Stopplösung: 250 μl Trypsin (10 mg/ml in FB188-Puffer), 10 μl SAHA (30 μM)

3.1.2.9 Immobilisierte Metall-Ionenaffinitätschromatographie (IMAC)

HDAC8-Puffer: 15 mM TRIS (pH 8,0), 3 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerol

Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare

3.1.2.10 Anionenaustauschchromatographie

Fractogel EMD TMAE-650, Merck

3.1.2.11 Zellkultur

3.1.2.11.1 Eukaryotische Zellkultur

Hek293: DMEM HAMS F12, Biochrom (10% (v/v) FCS (fetales Kälberserum, Fetal Bovine Serum), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin)

K562: RPMI 1640 Medium, Biochrom (10% (v/v) FCS, 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin)

PBS, Sigma

FCS PAA, Laboratories

Penicillin/Streptomycin, Sigma

Gentamycin, AppliChem

Trypanblau, Sigma

Lipofektamin, Invitrogen

Turbofekt, Thermo Scientific

JetPEI, Polyplus Transfection

MATra, Promokine

Trypsin PAA, Laboratories

3.1.2.11.2 Prokaryotische Zellkultur

Complete, Roche

LB-Agar-Platten (15 mg/ml LB-Medium, 8,3 mg/ml Agarose)

SOC-Medium (Derivat von Super optimal broth (SOB)): 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v)

Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose

LB-Medium (20 g/l)

2YT-Medium: 10 g/L Hefe-Extrakt, 16 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 72 mM K_2HPO_4 , 72 mM K_2HPO_4

TB-Medium: 24 g/L Hefe-Extrakt, 12 g/L Pepton, 4 mL/L Glycerin

Kanamycin (50 µg/µl)

Ampicillin in 50%-igem (v/v) Ethanol (100 µg/µl)

Spectinomycin (50 µg/mL)

1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

100 mM NiCl₂ in ddH₂O

50 mM EDTA in ddH₂O

3.1.3 Antikörper und Massenstandard

3.1.3.1 Marker

Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas

Page Ruler Unstained Protein Ladder, Fermentas

Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas

3.1.3.2 Primärantikörper

anti-HDAC8 (H-145), 1:1000, Santa Cruz

anti-alpha-tubulin (DM1A), 1:5000, Sigma

12G10 anti-alpha-tubulin (Concentrate), 1:2000, DSHB

anti-actyl-H3K9, 1:1000, Upstate

anti-CPTC-TOP-1-3 (Topoisomerase I) (Supernatant), 1:100, DSHB

anti-HDAC8, Sc-11544, 1:1000 Western Blot, 4 µg Immunpräzipitation, 1:50 Immunfärbung, Santa Cruz

anti-HDAC8, Sc-11544, Sc-11460, 4 µg Immunpräzipitation, Santa Cruz

anti-HDAC8, 17548-1-AP, 1:1000 Western Blot, 2 µg Immunpräzipitation, 1:50 Immunfärbung, Proteintech

Anti-His Serum, 1:1000, Roth

Anti-Acetyllysin, 1:1000, Cell Signaling

3.1.3.3 Sekundärantikörper

goat anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase, 1:10000, Sigma

rabbit polyclonal secondary antibody to mouse IgG – H&L (AP), 1:1000, Abcam

goat anti-rabbit IRDye 680LT, 1:20.000, Odyssey Li-Cor

goat anti-mouse IRDye 800LT, 1:20.000, Odyssey Li-Cor

DyLight680 NHS-Ester, 1:20000, Odyssey Li-Cor

Alexa fluor 488 goat anti-rabbit, 1:1000, Invitrogen

Alexa fluor 594 chicken anti-goat, 1:1000, Invitrogen

3.1.4 Plasmide

pQE70-HDAC8, Arbeitsgruppe Schwienhorst, Georg-August-Universität, Göttingen
pCDF PyITH2A, pCDF PyITH2B, pCDF PyITH3, Arbeitsgruppe Jason Chin, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (siehe Anhang)
pBKkanAcKRS3, Arbeitsgruppe Jason Chin, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (siehe Anhang)
pEGFPN2-N2 (Addgene)
pEGFPN2 HDAC8-EGFP (siehe Anhang)
pUBmEos2 (Addgene)
pEGFP-N2 HDAC8-mEOS2 (siehe Anhang)
pPSmOrange-N2 (Addgene)
pPsmO-N1 HDAC8-PsmO (siehe Anhang)
H2B-mCherry, Arbeitsgruppe Meckel, Technische Universität, Darmstadt

3.1.5 Kits

E.Z.N.A.TM Plasmid mini Kit I, Omega bio-tek
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Roche
BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific
DNA Clean & Concentrator-5m, Zymno Research
Recovery Kit, Zymno Research

3.1.6 Substanzen

SAHA, Cayman Chemical
PCI-34051, synthetisiert von Mathias Baud, Imperial College, London
MB-669, synthetisiert von Mathias Baud, Imperial College, London
LOPAC-Bibliothek, Sigma

3.1.7 Zelllinien

3.1.7.1 Humane Zelllinien

Hek293 (Embryonale Nierenzellen, human): DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
K562 (B-Lymphomazellen, human): DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
COS7 (Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie, Affe), Arbeitsgruppe Thiel, Technische Universität, Darmstadt
HaCaT (Keratinocyten, human), Arbeitsgruppe Polett, Hochschule, Darmstadt
OLN-93 (Oligodendroglia, Ratte), Arbeitsgruppe Dencher, Technische Universität, Darmstadt

SH-SY5Y (Neuroblastom, human), Arbeitsgruppe Dencher, Technische Universität, Darmstadt

HeLa (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, human), Arbeitsgruppe Löbrich, Technische Universität, Darmstadt

3.1.7.2 *Escherichia coli* (*E.coli*)

E.coli XI1-blue

E.coli BL-21

3.1.8 Laborequipment und -gerät

96-Well Half-Area Replica Plates, Greiner Bio-One

Blotkammer Trans Blot Semi-Dry, Biorad

CLSM Leica TCS SP, Leica Microsystems

Deep Well Plates, HJ Bioanalytik

Elektrophoresekammer Miniprotean-III, Biorad

Elektrophoresekammer, Biometra

Filterpapier, Whatman

Gefriertrocknungsanlage alpha 1.4 LSC, Christ

Netzgerät Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech

NanoDrop-Photometer, Peqlab

Odyssey, Licor

PCR Gerät T Gradient, Biometra

Polarstar, BMG Labtech

Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, Roche

Protein LoBind Tubes, Eppendorf

T25, T75, T175-Zellkulturflaschen, 6-Loch Platten, durchsichtig, Culture Dishes (Kulturschalen) (CD) 35, TPP

Taumelrollenmischer, TRM 50 IDL GmbH

Thermocycler (LabCycler, SensoQuest GmbH)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese im entsprechenden Medium aufgenommen und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach dem Anhaften der Zellen wurde das DMSO-haltige Medium entfernt und durch Kultivierungsmedium ersetzt.

3.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Eine Kultur mit einer Zellzahl von 1 bis 3×10^6 Zellen/mL (abhängig von der jeweiligen Zelllinie) wurde sedimentiert, Mediumreste mit PBS entfernt und das Zellpellet in 1 mL Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt und stufenweise auf eine Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Die Lagerung erfolgte in der Stickstoff-Gasphase bei mindestens $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.3 Zellkultivierung

Die Zelllinien wurden zur Stammerhaltung im entsprechenden Medium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 95% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden bei adhären wachsenden Zellen zunächst das Medium abgenommen, Mediumreste mit PBS entfernt und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden in FCS-haltigem Medium aufgenommen, so die Reaktion des Trypsins beendet und die vereinzelter Zellen entsprechend des Wachstumsverhaltens verdünnt. Suspensionszellen wurden vereinzelt und ebenfalls entsprechend verdünnt.

Für Zellkulturversuche wurden die Zellen mindestens 24 h vor Behandlungsbeginn eingesät.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer adäquaten Verdünnung in einer Bromphenolblau-Lösung aufgenommen, drei Kleinquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt.

3.2.1.5 Transiente Transfektion von humanen Zelllinien

Die transiente Transfektion unter Verwendung der beiden Transfektionsreagenzien Lipofektamin und Turbofekt beruht auf der Ausbildung eines Komplexes aus DNA und Transfektionsreagenz, der anschließend in die Zelle über Endozytose aufgenommen wird.

Die Turbofekt-Lösung beinhaltet kationische Polymere, die einen Komplex mit der DNA ausbilden. Die Ladung begünstigt hier die pH-Stabilität der Zelle. Intrazellulär kommt es zu einem Osmose-bedingten Anschwellen der Endosomen und schließlich zur Freisetzung der DNA nach Disruption.

Die Lipofektamin-Lösung besteht aus einer 3:1 (w/w) Liposom-Formulierung des polykationischen Peptids 2,3-Dioleoyloxy-N-[2(Spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium Trifluoroacetat (DOSPA) und des neutralen Lipids Phosphatidylethanolamin (DOPE).

Die zu transfizierende Zelllinie wurde in 6 Loch-Zellkulturplatten mit sterilen Deckgläschen ausgesät. Nach dem Adhären der Zellen wurde 1 bis 4 μg der DNA mit 250 μL Transfektionsmedium gemischt und 5 min relaxieren gelassen (Komponente A). 6 bis 8 μL

Turbofekt bzw. 10 µL Lipofektamin wurden ebenfalls zu 250 µL Transfektionsmedium gegeben und 5 min inkubiert (Komponente B). Komponente A und B wurden gemischt und nach einer 20-minütigen Inkubationszeit langsam auf die Zellen geträufelt. Abhängig von der Zelllinie und dem verwendeten Transfektionsreagenz wurde das Medium nach einer bestimmten Inkubationszeit entfernt und durch Kultivierungsmedium ausgetauscht.

Der Einsatz von JetPEI, Gene Juice bzw. MATra erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.1.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die entsprechende Zelllinie wurde auf Deckgläschen ausgesät und adhären gelassen. Das Medium wurde entnommen und Mediumreste mit PBS entfernt. Zur Fixierung der Zellen diente eine 15-minütige Inkubation mit 2,5% (v/v) Formaldehyd in PBS bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS bei RT wurden die Zellen 10 min bei 4 °C mit 0,25% (v/v) TritonX-100 in PBS sowie 1% (v/v) FCS permeabilisiert. Die Zellen wurden drei Mal 10 min mit 1% (v/v) FCS in PBS gewaschen und anschließend zur Vermeidung einer unspezifischen Antikörper-Hybridisierung 30 min bei RT mit 5% (w/v) BSA in PBS sowie 1% (v/v) FCS blockiert. Die fixierten Zellen sind bei 4°C in der Blockierlösung lagerbar.

Der immunologische Nachweis von HDCA8 erfolgte in einer feuchten Kammer zunächst unter Verwendung des Primärantikörpers ÜN bei 4 °C und nach dreimaligem Waschen mit PBS/FCS anschließend mittels des Sekundärantikörpers für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Das Volumen betrug jeweils 50 µL.

Nach dreimaligem Waschen wurden zur Kernfärbung die Deckgläschen in einer Lösung von 0,4 µg/mL DAPI in PBS 4 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Der Farbüberschuss wurde 4 min mit PBS entfernt.

Zur Aufbewahrung wurden auf einem Objektträger 3 µL Eindeckmedium vorgelegt und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei überführt. Die Versiegelung erfolgte mit Nagellack.

3.2.1.7 Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen am CLSM (konfokales Laser-Raster-Mikroskop, Confocal Laser Scanning Microscope)

3.2.1.7.1 Nachweis des GFP-Proteins (grün fluoreszierendes Protein, Green Fluorescent Protein)

Das Fusionsprotein aus GFP und HDAC8 wurde in Hek293-Zellen exprimiert und dessen Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm am CLSM Leica TCS SP (Leica Microsystems) mittels eines ArKr-Lasers über einen RSP500 dichroitischen Filter erfasst. Die Detektion der Fluoreszenzemission erfolgte zwischen 500 und 600 nm. Des Weiteren wurden die Zellen im Durchlichtmodus abgebildet.

3.2.1.7.2 Nachweis von mEos2

Das Protein mEos2 sowie das Fusionsprotein HDAC8-mEos2 wurde am CLSM Leica TCS SP (Leica Microsystems) nachgewiesen. Die Anregung des Fluorophors mEos2 erfolgte vor der Konvertierung (grün) mit einer Wellenlänge von 488 nm und nach der Konvertierung (rot) mit einer Wellenlänge von 561 nm. Die Konvertierung wurde bei 405 nm (UV-Licht) durchgeführt.

Zur Dokumentation des Bleicheffekts wurde eine ROI (Region of Interest, Bereich von Interesse) in einer Zelle eingefügt und die Fluoreszenzintensität (Ex 488 nm, Em 505-550 nm) als Mittelwert in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Diese Zelle lag benachbart zu einer photokonvertierten Zelle und sollte folglich den Einfluss des Prozesses auf den Fluorophor dokumentieren.

Zur Erfassung des Transportprozesses wurde in einer Messungen drei Kanäle erfasst: 1. Kanal: Durchlicht, 2. Kanal: Ex 488 nm, Em 505-550 nm, 3. Kanal: Ex 561 nm, Em 600 - 700 nm. Die Messung wurde in drei Bereiche unterteilt. In zehn Bildern mit einer Dauer von jeweils 0,211 sec wurde zunächst die Fluoreszenzintensität als Mittelwert einer ROI erfasst. Darauf folgten 20 Bilder des Schaltprozesses. Die Photoschaltung wurde insgesamt über eine Dauer von 147,057 sec dokumentiert.

Zur Auswertung wurde der ROI-Bereich der Schaltung markiert sowie im jeweilig anderen Kompartiment eine weitere ROI hinzugefügt. Der Mittelwert der Intensität (Ex 561 nm, Em 600-700 nm) wurde gegen die Zeit aufgetragen und für das photogeschaltete mEos2-Protein die Steigung während des Schaltprozesses ermittelt.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Zellyse

3.2.2.1.1 Zellyse zur Proteingewinnung

Trypsin dient in der Zellkultur dem Ablösen der Zellen von der Unterlage und zur Auflösung des Zellverbandes. Hier kann es auch zur Schädigung der Zellen kommen. Um eine Beeinflussung der Zellen durch die Trypsinbehandlung zu vermeiden, wurden die Zellen mechanisch abgelöst. Die Zellen wurden zwei Mal in PBS gewaschen, wobei die Sedimentation jeweils 5 min bei 2000xg und 4 °C erfolgte. In Folge der zweiten Sedimentation wurde eine T75-Zellkulturflasche in 200 µL Zellysepuffer aufgenommen. Zum Abbau der DNA wurde die Probe mit 2 µL Benzonase mindestens 1h bei 4 °C inkubiert und Membranbruchstücke bei 12000xg und 4 °C 10 min entfernt.

3.2.2.1.2 Fraktionierte Zelllyse

Die fraktionierte Zelllyse basiert auf dem Prinzip der schrittweisen Lyse zunächst der äußeren Zell- und anschließend der Kernmembran. Durch Zugabe eines hypotonischen Puffers werden bei 4 °C die Zellen zum Anschwellen gebracht. Die so destabilisierte Zellmembran wird durch Zugabe des Detergens TritonX-100 aufgelöst. Nach Abtrennen des Cytoplasmas erfolgt die Lyse der Kernmembran.

Das Ablösen der Zellen wurde wie unter 3.2.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Die zweite Sedimentation erfolgte abweichend schonend 5 min bei 300xg und 4 °C. Das Sediment wurde in 2 mL Puffer A aufgenommen und 5 min inkubiert, anschließend 0,1% (v/v) TritonX-100 (Hek293-Zellen) bzw. 0,05% (v/v) (K562-Zellen) zugegeben und die Zellen 30 sec invertiert. Die Kerne wurden bei 300xg für 5 min bei 4 °C separiert und diese in einem darauf folgenden Schritt über einen Sucrosegredienten gereinigt. Hierzu wurden zunächst 1 mL (K562-Zellen) bzw. 2 mL (Hek293-Zellen) S2-Lösung vorgelegt und mit dem in 1 mL (K562-Zellen) bzw. 2 mL (Hek293-Zellen) S1-Lösung aufgenommenen Kernpellet überschichtet. Die Abtrennung der Kernfraktion erfolgte mit 1400xg bei 4 °C für 5 min.

Zur morphologischen Untersuchung der Kernfraktion wurde diese in 250 µL S1-Puffer resuspendiert. Zur Kernlyse wurde das Pelett in 50 µL Puffer C aufgenommen und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zelltrümmer und die DNA wurden bei 14000xg 10 min abzentrifugiert.

3.2.2.2 Proteinquantifizierung

3.2.2.2.1 Bicinchoninsäure- (BCA)-Protein-Test

Der quantitative Proteinnachweis erfolgt nach dem Standardprotokoll des Bicinchoninsäure- (BCA Protein Assay) Test von Pierce. Das Nachweisprinzip beruht auf der Biuretreaktion, bei welcher Proteine in alkalischer Lösung Komplexe mit Cu^{2+} -Ionen eingehen und sie so zu Cu^+ reduzieren. Diese bilden mit dem Nachweisreagenz Bicinchoninsäure den violetten Farbkomplexes, dessen Extinktion bei 562 nm gemessen wird und ein Maß für die Proteinmenge ist. Die Konzentration wurde anhand der Extinktion eine Kalibriergerade von Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich zwischen 62,5 bis 1000 µg/mL ermittelt.

3.2.2.2.2 Absorptionsmessung

Während der Chromatographie wurde die Proteinmenge durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm dokumentiert.

3.2.2.3 Gelelektrophorese

3.2.2.3.1 SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Zur Proteinseparation wurden die Proben zunächst in zwei-fach SDS-Auftragspuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Das Erhitzen der Proben diente hier der

Aufhebung der Sekundär-, Tertiär- sowie der Quartärstrukturen. Das im Puffer enthaltene Reagenz SDS bindet an Proteine und überdeckt deren Eigenladungen, sodass eine Auftrennung basierend auf der konstant negativen Ladung ausschließlich auf der Proteingröße erfolgt.

10 µL des denaturierten Totalproteins (im Western Blot 30 µg Totalprotein) wurden in einem 12,5%-igen SDS-Gel (siehe 3.2.2.3.1) 1 h bei 150 V separiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde der Page Ruler Prestained Standard bzw. der Page Ruler Unstained Standard eingesetzt.

3.2.2.3.2 Coomassiefärbung

Färbeschritt	Lösung	Zeit
Färben	Coomassiefärbelösung	30 min
Entfärbelösung	Coomassieentfärbelösung	mind. 1 h

3.2.2.3.3 Silber-Färbung

Färbeschritt	Lösung	Zeit
Fixieren	Ethanol/Essigsäure/Wasser 50:12:38 (v/v/v)	1 h
Waschen	Ethanol/Wasser 50:50 (v/v)	3x je 20 min
Vorbehandeln	0,2 g Na ₂ S ₂ O ₃ in 500 ml ddH ₂ O	1 min
Waschen	ddH ₂ O	3x
Imprägnieren	0,4 g AgNO ₃ und 100 µl Formaldehyd in 200 ml ddH ₂ O	20 min
Waschen	ddH ₂ O	3x
Entwickeln	12 g Na ₂ CO ₃ mit 100 µl Formaldehyd in 200 ml H ₂ O	entsprechend
Waschen	ddH ₂ O	2x 2 min
Stoppen	Ethanol/Essigsäure/ddH ₂ O 50:12:38 (v/v/v)	

3.2.2.3.4 Native PAGE

Zur Erhaltung der Proteinkonformation und insbesondere von Proteinkomplexen findet die native PAGE Einsatz. Hier entfällt der anfängliche Denaturierungsschritt, sodass die Proteine direkt auf das Gel aufgegeben wurden. Zur besseren Befüllbarkeit der Taschen wurde den Proben 1% (v/v) Glycerin hinzugegeben.

Auf Grund des isoelektrischen Punktes weisen die meisten Proteine bei einem pH-Wert zwischen 8 und 9 eine leicht negative Ladung auf, die eine Separation zur Anode ermöglicht. Daraus resultiert ein Trennergebnis basierend auf der Ladung, der Größe sowie der Konformation der einzelnen Proteine.

Im Verhältnis 1:2 wurden die Proben mit dem Auftragspuffer für die native Gelelektrophorese versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandards fanden je 5 µL alpha Lactalbumin (14,2 kDa) sowie Albumin aus Hühnereiweiß (45,0 kDa) Einsatz. Die Trennung erfolgt bei 4 °C und 150 V, wobei die Dauer anhand der Laufstrecke abgeschätzt wurde.

3.2.2.4 Western Blot-Analyse

Dem immunologischen Nachweis des Zielproteins dient die Western Blot-Analyse.

Anschließend an die Separation in einer SDS- (siehe 3.2.2.3.1) bzw. nativen PAGE (siehe 3.1.2.2.2) erfolgte im Semi-Dry-Verfahren der Transfer des Proteins bei 20 V über 90 min auf eine PVDF-Membran. Der Aufbau des Western Blots von unten (Anode) nach oben (Kathode) erfolgte wie angegeben:

Kathode	
Kathodenpuffer	3 Filterpapiere
Kathodenpuffer	Gel
Anodenpuffer 2 (zunächst 30 sec in Methanol)	Membran
Anodenpuffer 2	2 Filterpapiere
Anodenpuffer 1	1 Filterpapier
Anode	

Zur Entfernung von Luftblasen wurde der Westernblotaufbau unter leichtem Druck gewalzt.

Die mit TBST gewaschene Membran (1x 5 min) wurde zunächst für 1 h bei RT mit dem Odyssey Blocking Buffer blockiert und anschließend erneut dreimal für 5 min mit TBST/0,01% (v/v) Tween gewaschen. Die Antikörper-Verdünnung sowie die Inkubationsdauer erfolgten nach Herstellerangaben, wobei zwischen den beiden Inkubationsschritten dreimal für 5 min mit TBST gewaschen wurde. Die Sekundärantikörper-Inkubation wurde 1 h bei RT durchgeführt. Zwischen den beiden Inkubationen wurde drei Mal mit TBST/0,01% (v/v) Tween gewaschen. Im Anschluss an die Sekundärantikörper-Inkubation wurde der überschüssige Antikörper zweimal mit PBS/0,01% (v/v) Tween 20 sowie einmal mit PBS entfernt.

Das Nachweisprinzip beruht auf dem Einsatz eines Fluorophors, welcher an den Sekundärantikörper gekoppelt wurde. Dem System stehen hier zwei unterschiedliche Fluorophore zur Verfügung, wobei diese bei 680 bzw. 800 nm angeregt werden. Die Dokumentation erfolgte unter Verwendung des Licor-Systems. Alternativ wurde der Nachweis mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid durchgeführt. Hierzu wurde die Membran mit 15 ml

Färbelösung (15 ml AP-Puffer, 66 µl BCIP (50 mg BCIP in 1 ml 100% DMFA), 51 µl NBT (50 mg NBT in 1 ml 70% DMFA)) für ca. 10 min inkubiert und die Reaktion durch mehrfaches Spülen mit ddH₂O abgestoppt.

3.2.2.5 Präzipitation

3.2.2.5.1 Immunpräzipitation

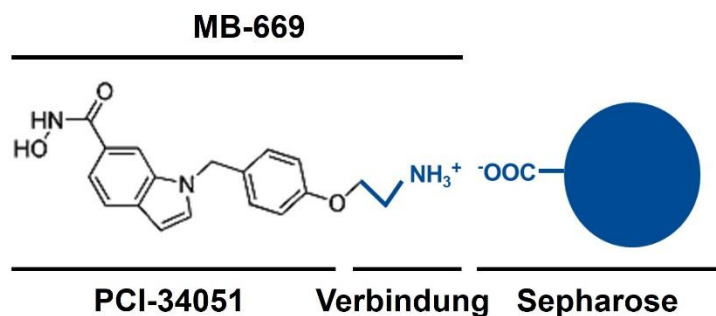
Zur spezifischen Präzipitation von Proteinen aus Zelllysaten wurden 25 µL der ProteinG-gekoppelten Dynabeads der Firma Invitrogen in ein Gefäß mit reduzierter Oberflächenassoziation überführt, diese zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer entsprechenden Menge an Antikörper versetzt. Im Anschluss an die sechs-stündige Inkubation bei 4 °C unter Invertieren wurden die Dynabeads vorsichtig mit 500 µL 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4) gewaschen.

Die Quervernetzung erfolgte mit 360 µL 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4) sowie 40 µL DSS (432 µL DMSO + 10 mg DSS) für 30 min bei RT. Das DSS diente der kovalenten Bindung des Antikörpers an die Dynabeads über die Verbindung primärer Aminofunktionen und sollte eine Dissoziation während der Elution verhindern. Die Hitze- und denaturierenden Bedingungen könnten bei der Elution zum Zerfall des Antikörpers in die leichte und schwere Kette führen und so das Signal im Western Blot maskieren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µL 1 M TRIS (pH 7,5) und eine anschließende Inkubation von 15 min bei RT unter Invertieren beendet. Nach 7 min wurde die Lösung ausgetauscht. Bei sehr guter Affinität des Antikörpers zum ProteinG wurde auf den Quervernetzungsschritt verzichtet.

Zu den Dynabeads wurde nach zweimaligem Waschen mit 500 µL PBS die Proteinlösung hinzugegeben und ÜN bei 4 °C unter Invertieren inkubiert. Die Elution erfolgte in 50 µL SDS-PAGE-Auftragspuffer für 15 min bei 95 °C und 550 rpm.

3.2.2.5.2 Substanz-affine Präzipitation

In Kooperation mit Matthias Baud (Imperial College, London) wurde über ein kurzes Verbindungsstück die HDAC8-selektive Substanz PCI-34051 an Sepharose gekoppelt (nachfolgend als Sepharose/MB-669 bezeichnet). Dies sollte als Präzipitationsmöglichkeit der Identifikation von HDAC8-Bindungspartnern dienen (siehe Abbildung 5).

**Abbildung 5: Bildung der Sepharose/MB-669.**

Die Substanz PCI-34051 wurde mit einem kurzen Verbindungsstück versehen (bezeichnet als MB-669), welches der Bindung an die Carboxylfunktion eines Sepharosepartikels diente. Dies geschah unter Ausbildung eines Carbonsäureamid (in der Abbildung nicht dargestellt).

Hierzu wurde 50 µL der Sepharose/MB-669 zwei Mal mit 500 µL PBS gewaschen, ÜN mit 50 µL Zelllysate (siehe 3.2.2.1.1) inkubiert und anschließend die Elution bei 95 °C für 15 min in 50 µL SDS-PAGE-Auftragspuffer durchgeführt.

3.2.2.5.3 Co-Präzipitation und die Identifikation von HDAC8-Protein-Interaktionen

Die etablierte Co-Präzipitation sah zunächst die Immobilisierung von rekombinant hergestelltem HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2.3) über den HisTag an eine Nickel-Sepharose-Säule vor. Anschließend wurde ein Zelllysate aus Hek293-Zellen (siehe 3.2.2.1.1) auf die Säule aufgegeben und so die Bindung potentieller Interaktionspartnern herbeigeführt. Die Co-Elution des HDAC8-Proteins wurde durch eine SDS-PAGE nachgewiesen werden, wobei die Identifikation der Interaktionspartner über die PMF-Methode (siehe 3.2.2.6) erfolgte.

Es wurden 5 mL Zelllysate (siehe 3.2.2.1.1) mit einer Konzentration von ca. 10 mg/mL eingesetzt, wobei dieses zur Reduktion der Detergenzkonzentration in 30 mL HDAC8-Puffer aufgenommen wurde.

Protokoll der IMAC zur Co-Präzipitation von HDAC8 und Interaktionspartnern:

Lösung	Menge [mL]	Durchflussrate [mL/min]
ddH ₂ O	30	2
100 mM NiCl ₂ in ddH ₂ O	30	2
ddH ₂ O	30	2
HDAC8-Puffer	30	2
Zelllysate, HDAC8	30	1
40 mM Imidazol in HDAC8-Puffer	2 Fraktionen a 25	1
200 mM Imidazol in HDAC8-Puffer	30	1

HDAC8-Puffer	30	1
Zellysat, Hek293-Zellen	30	1
<i>Inkubation üN, 4°C</i>		
HDAC8-Puffer	30	1
1 M Imidazol in HDAC8-Puffer	80 Fraktionen ca. 0,15	1
50 mM EDTA in ddH ₂ O	20	2
ddH ₂ O	20	2
1 M NaOH	20	2
20% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	20	2

3.2.2.6 Peptidmassen Fingerprinting (PMF, Peptide Mass Fingerprinting)

Die Durchführung der Methode erfolgte durch die Abteilung für Massenspektroskopie von Julian Langer am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt.

Die PMF-Methode wurde zur Identifikation von Proteinen eingesetzt. Diese wurden zunächst in einer 12,5%-igen SDS-PAGE separiert und anschließend reduziert, alkylisiert, trypsinisiert sowie chymotrypsiniert (Standardvorschrift Proteoextract Digestion Kit, CalBiochem).

Die Lösung wurde auf eine nano-HPLC-Säule aufgetragen. Diese war mit einer Reverse Phase-Matrix (Proxeon easy-nLC) beladen. Es wurden eine Vorsäule (Partikelgröße 5 µm, C18, L=20 mm) sowie eine analytische Säule (Partikelgröße 5 µm, C18, L=15 cm) von NanoSeparations (Nieuwkoop, Niederlande) verwendet. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 5 bis 65% (v/v) B (Puffer A: Wasser, 0,1% (v/v) Ameisensäure; B: Acetonitril, 0,1% (v/v) Ameisensäure) innerhalb von 25 min, wobei eine Durchflussrate von 300 nL/min Verwendung fand.

Zur Ionisierung der zu eluierenden Proteine wurden eine Bruker Apollo ESI-Quelle mit einem nanoSprayer-Emitter verwendet. Die Analyse wurde mit einem Quadropol Flugzeit-Massenspektrometer (Bruker maXis) durchgeführt. Der Massenbereich war von 50 bis 2200 m/z gewählt, wobei die Sequenzinformation über ein Computer-gesteuertes, Daten-abhängiges Umschalten zum MS/MS-Modus erlangt wurde. Zur Auswertung wurde basierend auf dem Masse-/ Ladungs-Verhältnis der Ionen die Kollisionsenergie ermittelt. Die Rekalibrierung erfolgte auf die autoproteolytischen Trypsinfragmente.

Unter Verwendung eines Standard-Proteomic-Skripts der Software Bruker DataAnalysis 4.0 Service Pack 1 Build 253 erfolgte die Auswertung der Daten. Diese wurden dann mit der NCBI-Datenbank auf einem lokalen Mascot-Server (Version 2.2.2, Matrix Science, UK) abgeglichen, wobei zur Identifikation eine Massentoleranz der Haptionen von ±0,05 Da festgelegt wurde.

Aus der Re-Sequenzierung offener Leserahmen erhaltene Daten wurden durch die Software BioTools 3.1 (build 2.22, Bruker Daltonics) analysiert und validiert.

3.2.2.7 Quervernetzen von Proteinen

3.2.2.7.1 Quervernetzen von Proteinen mit Formaldehyd bzw. para-Formaldehyd

Adhärente Zellen wurden zunächst mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend schonend durch Auf- und Abpipettieren in 5 mL PBS aufgenommen. Die Zellen wurden 5 min bei 2000xg bei 4 °C sedimentiert und in 1 mL PBS aufgenommen. 50 µL der Zelllösung wurden zu 950 µL einer Formaldehyd- bzw. para-Formaldehyd-Lösung in PBS entsprechender Konzentration hinzugegeben und bei der jeweiligen Temperatur und Zeit inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL einer 1,25 M Glycin-Lösung beendet. Im Anschluss wurden eine Zelllyse (siehe 3.2.2.1.1) sowie eine Proteingehaltsbestimmung (siehe 3.2.2.2.1) durchgeführt. Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer vermischt und bei der entsprechenden Denaturierungszeit und -temperatur behandelt.

3.2.2.7.2 Quervernetzen von Proteinen mit DSS

Analog zu 3.2.2.7.1 wurden die Zellen in 1 bzw. 5 mM DSS in PBS aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert.

3.2.2.7.3 Quervernetzen von Proteinen mit Formaldehyd in Kombination mit DSS

Das intrazelluläre Quervernetzen von Proteinen erfolgte direkt in der Zellkulturflasche. Zunächst wurden Mediumreste mit PBS entfernt, dann mit 0,1% DSS für 25 min bei RT und anschließend mit 1% Formaldehyd für 10 min ebenfalls bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 mM Glycin für 10 min abgestoppt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.2.2.7.1 beschrieben.

3.2.2.8 Lyophilisieren

Ein Probenvolumen von jeweils 100 µL wurde in der Gefriertrocknungsanlage alpha 1.4 LSC (Christ) bei 0,220 mbar und -10 °C über Nacht unter Vakuum gefriergetrocknet.

3.2.2.9 Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie

Die Erfassung des NMR-Spektrums erfolgte durch die Abteilung NMR der TU Darmstadt. Die NMR-Spektren werden mit einem Avance300 (AC300) (300 MHz) Spektrometer aufgenommen, wobei die chemische Verschiebung für jedes Signal in δ -Einheiten (ppm, Teile einer Millionen) relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben und dessen Verschiebung als Referenz festgesetzt wurde (δ (TMS) = 0). Die Kopplungskonstanten (J) wurde in Hz angegeben.

3.2.3 Chipentwicklung in Kooperation mit der Firma PEPperPrint

In Kooperation mit der Firma PEPperPrint wurde ein Chipdesign unterschiedlicher Peptidsequenzen entworfen. Grundlage hierfür waren stochastisch erstellte sowie aus der Acetylomuntersuchung bekannte Peptidsequenzen (Choudhary *et al.*, 2009; Gurard-Levin und Mrksich, 2009; Zhao *et al.*, 2006; Kovacs *et al.*, 2005). Daraus resultierte eine Anzahl an 615 potentieller HDAC8-Substrate, die randomisiert in einer Mehrfachbestimmung aufgetragen wurden

Das Prinzip der Peptidsynthese basiert auf dem Einsatz eines Peptid-Laser-Printers (siehe Abbildung 6). Zunächst wird das N-ständige Peptid auf einen beschichteten Glasträger immobilisiert und das jeweilige N2-Peptid aufgetragen. Der darauf folgende Schmelzvorgang initialisierte den Kopplungsvorgang, da die erhöhte Temperatur zum Schmelzen der Toner-Matrix führt und dann als Lösungsmittel für die Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester dient. Im Anschluss an einen Wachschritt wird die Fmoc-Gruppe der Aminosäure entfernt und so die Kopplung weiterer Aminosäuren ermöglicht. Durch das gezielte Ansteuern der Aminosäureeinheit bestimmter Positionen auf dem Trägermaterial kann die Bildung von definierten Peptidsequenzen in räumlicher Nähe gewährleistet werden. Die Produktion der Chips sowie der Nachweis der Deacetylierungsreaktion nach Inkubation mit HDAC8 wurden durch die Arbeitsgruppe von Ralph Bischoff der Firma PEPperPrint durchgeführt

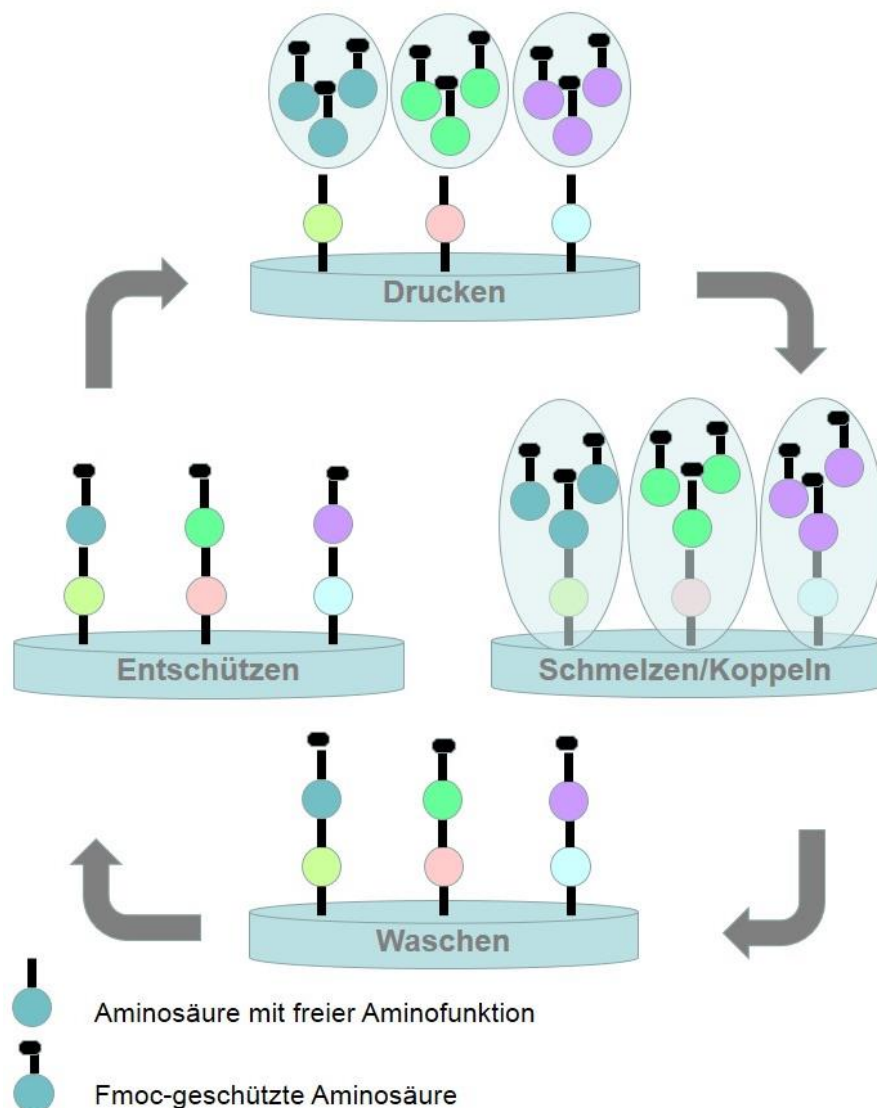


Abbildung 6: Schema der Peptidsynthese nach PEPPERPrint.

Auf einen Träger werden Aminosäuren aufgebracht, diese über einen Schmelzprozess an gebundenen Aminosäuren gekoppelt und für den weiteren Aufbau des Peptids die Fmoc-Schutzgruppe entfernt.

Die Lysingruppen der Peptide wurden acetyliert. Hierfür wurde der Chip mit 1 mM Acetyl-NHS in PBST (pH 7,4) üN bei RT behandelt. Nach dreimaligem Waschen von jeweils 5 min mit PBST (pH 7,4) fand die Deacetylierungsreaktion statt. Hier kam rekombinant produziertes und aufgereinigtes HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2.3) zum Einsatz. Im Falle eines additiven Blockierschrittes erfolgte dieser vor Proteinbehandlung mit Rockland MB-070 für 1 min in PBST bei pH 7,4.

Der Nachweis erfolgte mittels anti-AcLys-Antikörper und Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 bzw. als Direktmarkierung mittels DyLight680 NHS-Ester. Die Intensitäts-Erfassung wurde mit dem Licor Odyssey bei entsprechender Wellenlänge durchgeführt.

3.2.4 Fluoreszenzbasierte Methoden

3.2.4.1 Nachweis der HDAC-Aktivität

Das Prinzip des Aktivitätstests beruht auf einer Deacetylierung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC mit anschließendem tryptischen Verdau und Freisetzung des fluoreszenten Moleküls AMC [Wegener *et al.*, 2003]

Pipettierschema zum Nachweis von HDACs:

Lösung	Positivkontrolle [μL]	Negativkontrolle [μL]
HDAC-Probe	10	-
FB188-Puffer	70	80
Boc-Lys(TFA)-AMC	20	20
<i>Inkubation: 1 h bei 30 °C, zunächst 1 min Schütteln bei 450 rpm</i>		
Stopplösung (30 μM SAHA / 10 mg/mL Trypsin, Verhältnis 1:250)	20	20
Messung am Polarstar von BMG Labtech ($\lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{EX}} = 460 \text{ nm}$)		

3.2.4.2 Nachweis der HDAC-Aktivität nach Behandlung mit Prüfsubstanzen

Das Prinzip des Aktivitätstest kann ebenfalls auf den Nachweis einer potentiellen Substanzwirkung auf die HDAC-Aktivität angewendet werden. Hierzu wurde der klassische Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) durch einen Inkubationsschritt mit der jeweiligen Substanz erweitert.

15 μL des Proteins wurden zunächst in der ersten Kavität vorgelegt und anschließend 105 μL der jeweiligen Substanz hinzugegeben. In Kavität 2 bis 10 wurden jeweils 10 μL Protein und 70 μL Puffer vorgelegt und ausgehend von der ersten Kavität eine 1:3-Verdünnung durchgeführt, sodass ein Volumen von 80 μL resultierte. Darauf folgend wurde eine Inkubation von 15 Minuten im Anschluss an einen 1-minütigen Schüttelschritt bei 450 rpm durchgeführt. Sowohl die Negativ- als auch die Positiv-Kontrolle erfolgten analog dem Aktivitätstest zum Nachweis einer HDAC-Aktivität.

Die HDAC8- sowie die Substrat-Konzentration an HDAC-Protein sowie -Substrat zum Nachweis einer Wirkung von Prüfsubstanzen (wenn nicht davon abweichend angegeben)

HDAC	Proteinkonzentration [nM]	Substratkonzentration [μM]
HDAC1	7,4	80 (Boc-Lys(Ac)-AMC)
HDAC2	10	40 (Boc-Lys(Ac)-AMC)
HDAC3	10,3	40 (Boc-Lys(Ac)-AMC)
HDAC4	2,8 bzw. 0,2	30 (Boc-Lys(TFA)-AMC)
HDAC5	2,1	80 (Boc-Lys(TFA)-AMC)
HDAC6	3,1	100 (Boc-Lys(Ac)-AMC)
HDAC7	0,1	60 (Boc-Lys(TFA)-AMC)
HDAC8	23,6 bzw. 0,2	40 (Boc-Lys(TFA)-AMC)
HDAC9	5,4	40 (Boc-Lys(Ac)-AMC)

3.2.4.3 Screening der LOPAC-Bibliothek gegen das HDAC8-Protein

Zur Bereitstellung ausreichender HDAC8-Proteinmengen wurde zunächst eine rekombinante Produktion in *E.coli* XL1 Blue-Zellen (siehe 3.2.6.2.3) mit anschließender Aufreinigung sowie Charakterisierung durchgeführt. Eine Proteinkonzentration von 80 nM wurde bei einer Substratkonzentration an Boc-Lys(TFA)-AMC von 30 μM und einer Inhibitorkonzentration von 12,5 μM im Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) eingesetzt.

Zunächst wurde der IC₅₀-Wert von SAHA gegen HDAC8 bestätigt, sodass eine volle Funktionalität des Proteins gewährleistet war. Des Weiteren wurde die Test-Güte anhand des Z'-Wertes bestimmt. Hierzu wurde eine Platte mit 48 Positiv- sowie 48 Negativ-Kontrollen angelegt, wobei ein Schwellenwert von 0,8 festgelegt wurde. Zhang, Chung und Oldenburg hat im Jahr 1999 diesen Parameter zu Bestimmung der Eignung eines Tests zur Verwendung in einer Screening-Kampagne etabliert. So ist der Wert mit

$$Z' = 1 - 3 * \frac{\text{Standardabweichung Positivkontrolle} + \text{Standardabweichung Negativkontrolle}}{\text{Mittelwert Positivkontrolle} - \text{Mittelwert Negativkontrolle}}$$

Abhängig von der Standardabweichung sowie dem Messfenster. Ein Z'-Wert von 0,5 bis 1,0 ist als Test-tauglich anzusehen.

Zur Identifikation von HDAC8-Inhibitoren wurde die LOPAC-Bibliothek in einer Konzentration von 1 μM durch eine 1:10-Verdünnung von 1 μL der Substanz in DMSO auf Mutterplatten (Deep Well Plates, HJ Bioanalytik) übertragen. Durch Zugabe von 190 μL Methanol wurde eine 1:20-Verdünnung erzeugt und diese auf acht Tochterplatten (96-Well Half-Area Replica

Plates, Greiner Bio-One) transferiert. Das Methanol wurde vollständig entfernt und die Platten anschließend bei -20 °C gelagert.

Zu den Substanzen wurde zunächst 10 µL Protein sowie 70 µL FB188-Puffer hinzugegeben und 1 min bei 450 rpm und RT geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 20 µL Substrat hinzugegeben und erneut für 1 min bei RT und 450 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde nach 1 h Inkubation durch Zugabe von 20 µL Stopplösung beendet. Zusätzlich zu den 88 Substanzen wurden jeweils vier Positiv (Protein ohne Inhibitor)- sowie vier Negativ (ohne Protein und ohne Inhibitor)- Kontrollen angefertigt. Die Normierung erfolgte auf den Mittelwert der Platte.

3.2.4.4 Konkurrenztest zum Nachweis einer Bindung von Histonen an das HDAC8-Protein
Analog zum Nachweis einer Wirkung von Prüfsubstanz (siehe 3.2.4.2) erfolgt der Nachweis der Bindung der Histone an das HDAC8-Protein. Es wird von einer erhöhten Affinität eines natürlichen Substrates im Vergleich zum künstlichen Substrat Boc-Lys(TFA)-AMC ausgegangen, sodass eine Bindung in einem verringerten Signal resultieren sollte. Zu 15 µL Protein wurden hier 105 µL Histon hinzugegeben und davon ausgehend ebenfalls eine 1:3-Verdünnungsreihe durchgeführt.

3.2.5 Chemische Methoden

3.2.5.1 LC (Flüssigchromatographie, Liquid Chromatographie)/MS (Massenspektroskopie)-Messung zum Nachweis einer Mono-Acetylierung an Histonen

Die LC-ESI-HR-MS-Messungen (hochauflösende Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisationsmassenspektroskopie) wurden durch Daniel Petras (Chemisches Institut, TU Berlin) an einem Orbitrap XL Massenspektrometer sowie einem Agilent HPLC-System durchgeführt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL in 5% (v/v) Acetonitril (ACN) mit 1% (v/v) Ameisensäure verdünnt und für 10 min bei 12.000xg zentrifugiert. Zur RP-Separation fand eine Suppelco Discovery 300 Å C18 Säule (2 x 15 mm, 3 µm) mit H₂O und ACN mit 0,1% (v/v) Ameisensäure als mobile Phase Einsatz. Der lineare Gradient von 5% (v/v) bis 70% (v/v) ACN über 20 min, gefolgt von einer 5-minütigen Ausschwemmphase mit 70% (v/v) ACN wurde bei einer Flussrate von 0,3 mL/min durchgeführt. Das Top/Down MS/MS-Spektrum wurde direkt im IDA-Modus (Top1) unter Verwendung von CID (CE 35, 30 ms Aktivierung) durchgeführt und der Survey-Scan wurde bei R= 30.000 und 400 m/z und einer maximalen Füllzeit von 250 ms. Der Produktionenscan erfolgte mit R= 30.000 und 400 m/z mit einer maximal Füllzeit von 250 ms. Die Massenspektren wurden unter Verwendung von Magtran und die MS/MS-Spektren manuell erhoben.

3.2.5.2 Produktion von Acetyl-Lysin nach Dose *et al.* (2011)

Die Produktion des Acetyl-Lysins erfolgte durch Benjamin Horstmann (Arbeitsgruppe Meyer-Almes, Hochschule Darmstadt) bzw. unter dessen Anleitung.

Zur Produktion wurde in einem Rundkolben 0,135 mol Lysin * 1 HCl (Lysinhydrochlorid), 0,069 mol CuSO₄ * 5 H₂O (Kupfersulfat-Pentahydrat) in 1 M NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat) gelöst und 10 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,150 mol Essigsäureanhydrid gestartet. Nach 48 h Reaktionszeit wurden die blauen Kristalle durch Filtration gewonnen. Das Filtrat wurde eingeeengt und erneut für 24 h in der Reaktion eingesetzt. Die Lösung wurde filtriert, die Kristalle vereinigt und der Kupferkomplex in 1 L H₂O gelöst. Der Komplex wurde mit 3-fach molarem Überschuss an 8-Hydroxiquinolin für 24 h umgesetzt. Die Kristalle wurden mittels Filtration abgetrennt, die wässrige Phase drei bis vier Mal mit Ethylacetat gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

3.2.6 Rekombinante Proteinexpression

3.2.6.1 Einführung von Histon-Acetylierungen an der Aminosäure Lysin

3.2.6.1.1 Produktion von mono-acetylierten Histonen nach Neumann *et al.* (2008)

Eine Vorkultur mit 50 mL LB/Kan/Spec/AcK (Kanamycin bzw. Spectinomycin: jeweils 50 µg/mL) wurde mit einer Kolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Das gesamte Volumen wurde in 1 L LB-Medium mit 10 mM Acetyllysin transferiert und die Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 0,8 kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 mM NAM gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation. Hierdurch sollen die *E.coli* Deacetylase CobB inhibiert werden. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG ÜN bei 37 °C und 150 rpm induziert.

Zum Aufschluss der Zellen wurde zunächst die Biomasse über einen Zentrifugationsschritt bei 9.800xg für 15 min bei 4 °C gewonnen und diese mit 10 mL PBS/20 mM NAM gewaschen, wobei im Anschluss an den letzten Waschschrift die Zellen bei 4 °C sonifiziert (dreimal 30 sec mit einer Amplitude von 50%) wurden.

Die Einschlusskörperchenfraktion wurden 15 min bei 12.000xg und 4 °C abzentrifugiert, zweimal mit PBS (pH 7,4)/1% (v/v) Triton X-100/20 mM NAM und einmal mit PBS (pH 7,4)/20 mM NAM waschen. Das Pelett wurde in 1 mL DMSO gelöst, für 30 min bei RT inkubiert, anschließend in 25 mL 6 M Guanidiniumhydrochlorid/20 mM TRIS (pH 8,0) aufgenommen und weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Extraktion erfolgte für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Die Proteinseparation erfolgte für 15 min bei 12.000xg und 4 °C.

3.2.6.1.2 Aufreinigung

Die Proteinlösung wurde vollständig in einer IMAC eingesetzt, wobei die Elution über eine pH-Wert-Änderung erfolgte.

Protokoll der IMAC zur Aufreinigung von Histonen (pH-Wert-Änderung):

Lösung	Menge [mL]	Durchflussrate [mL/min]
ddH ₂ O	20	2
100 mM ZnCl ₂ /ddH ₂ O	20	2
ddH ₂ O	20	2
Extraktionspuffer	20	2
Einschlusskörperchen-Fraktion	25	1
8 M Harnstoff/100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 6,2)	100	1
7 M Harnstoff/20 mM Natriumacetat/ 200 mM NaCl (pH 4,5)	40 (je 2)	1
1 M Imidazol in 20 mM Kaliumphosphatpuffer	20	1
50 mM EDTA/ddH ₂ O	20	2
ddH ₂ O	20	2
1 M NaOH	20	2
20% (v/v) EtOH/ddH ₂ O	20	2

Alternativ erfolgte die Elution unter Verwendung eines Imidazolgradienten.

Protokoll der IMAC zur Aufreinigung von Histonen (Imidazolgradient):

Lösung	Menge [mL]	Durchflussrate [mL/min]
ddH ₂ O	20	2
100 mM ZnCl ₂ /ddH ₂ O	30	2
ddH ₂ O	30	2
HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol	30	2
Einschlusskörperchen-Fraktion	25	1
HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol	30	1
Imidazolgradient (0 – 1 M) /HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol	50 (je 2)	1
50 mM EDTA/ddH ₂ O	20	2
1 M NaOH	20	2
20% (v/v) EtOH/ddH ₂ O	30	2

3.2.6.2 Rekombinante Expression und anschließende Aufreinigung des HDAC8-Proteins

3.2.6.2.1 Rekombinante Expression des HDAC8-Proteins

Die rekombinante Produktion des HDAC8-Proteins erfolgte im Bakterienstamm *E.coli* XL1-Blue (wenn nicht abweichend angegeben). Zur Anzucht wurden zunächst durch Inokulation (Kyrostocks) eine Vorkultur (50 mL LB-Medium/50 µg/mL Ampicillin) angeimpft und anschließend für 16 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. 5 mL der Vorkultur wurden in 1 L LB-Medium der Hauptkultur überführt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 1mM IPTG bei einer Konzentration.

Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurde die Biomasse durch eine Zentrifugation von 15 min bei 12.000 g und 4 °C gewonnen.

3.2.6.2.2 Aufschluss von *E.coli*-Zellen zur Gewinnung des HDAC8-Proteins

Die Biomasse wurde in HDAC8-Puffer resuspendiert und die Zellen bei 4 °C gekühlt mit Ultraschall in drei Durchgängen je 30 sec und einer gepulsten Amplitude von 50% (0,5 sec, Pause 0,5 sec) aufgeschlossen.

3.2.6.2.3 Aufreinigung des HDAC8-Proteins nach dem Standardverfahren

Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung diente der Vorreinigung des Zelllysates, um die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung von Fremdproteinen an das IMAC-Säulenmaterial zu reduzieren. Das Löslichkeitsverhalten eines Proteins ist von der Interaktion geladener Oberflächenstrukturen mit dem umgebenden Lösemittel abhängig. Ammoniumsulfat entzieht Proteinen die Hydrathülle, was zu Akkumulation begünstigt durch die Interaktion hydrophober Bereiche der Proteine führt. Abhängig von der Hydrophobizität präzipitieren so apolare Proteine bei geringerer Salzkonzentration als polare [Wingfield, 2001].

Anhand des Fällungsverhaltens des HDAC8-Proteins wurde der Fraktionsbereich ermittelt. HDAC8 fällt über einen weiten Bereich zwischen 25% und 55% Sättigung. Jedoch führte eine Fällung bei einer Sättigung von 25% nicht zum gewünschten Aufreinigungsergebnis, sodass standardisiert bei einer Sättigung von 40% präzipitiert wurde.

Hierzu wurde die Menge an Ammoniumsulfat innerhalb von 20 min im Lysat bei 4 °C gelöst und die Proteine anschließend 30 min ebenfalls bei 4 °C gefällt. Das HDAC8-Protein wurde von präzipitiertem Protein durch eine Zentrifugation bei 12.000xg für 10 min bei 4 °C getrennt.

IMAC

Protokoll der IMAC nach dem Standardverfahren zur Aufreinigung des HDCA8-Proteins:

Lösung	Menge [mL]	Durchflussrate [mL/min]
ddH ₂ O	30	2
100 mM NiCl ₂ /ddH ₂ O	30	2
ddH ₂ O	30	2
HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol	30	2
Zelllysate, HDAC8-Protein	30	1
40 mM Imidazol/HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol	50 (je 25)	1
Imidazolgradient (0 – 1 M) /HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol	50 (je 2)	1
50 mM EDTA/ddH ₂ O	20	2
ddH ₂ O	20	2
1 M NaOH	20	2

Die Elution mittels pH-Wert-Änderung erfolgte nach dem Standardprotokoll zur Aufreinigung. Der Zellaufschluss wurde davon abweichend analog des Standardaufreinigungsprotokolls, jedoch erfolgte der Zellaufschluss in MES-Puffer (pH 6,0). Des Weiteren wurde zum Äquilibrieren und Spülen der Säule ebenfalls MES-Puffer eingesetzt. Die pH-Wert-Änderung erfolgte mit Hilfe eines Gradienten gegen HDAC8-Puffer (pH 8,0).

Anionenaustauschchromatographie

Es wurde eine Säule mit 5 mL Fractogel beladen. Nach der Sedimentation des Materials wurde die Chromatographie manuell durchgeführt.

Protokoll der Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung des HDAC8-Proteins:

Lösung	Menge [mL]	Durchflussrate [mL/min]
HDAC8-Puffer	20	Äquilibrieren
HDAC8-Protein	30	Probenaufgabe
HDAC8-Puffer	10 mL	Spülen
50 mM NaCl	2	Eluieren
100 mM NaCl	2	Eluieren
200 mM NaCl	2	Eluieren
500 mM NaCl	2	Eluieren
1000 mM NaCl	5 Fraktionen a 2	Eluieren
HDAC8-Puffer	20 mL	Spülen

Dialyse des Proteins

Zum Austausch des Lösemittels wurde die Probe in gewässerte Dialyseschläuche (20 min in ddH₂O) mit einer MWCO von 12.000 bis 14.000 Da überführt und dreimal gegen ein 100-faches Volumen dialysiert. Die Dauer betrug hier zweimal 3 h und einmal üN.

3.2.7 Molekularbiologische Methoden

3.2.7.1 Amplifikation des HDAC8-Gens und Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Die Gen-Amplifikation erfolgte in der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung einer DNA-Polymerase und dNTPs. Der Anlagerung der Polymerase dienen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die sich komplementär an die beiden Enden des zu vervielfältigenden Gens anlagern. Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen verfügen die Primer über entsprechende Überhänge.

Beispiel für einen PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	1 ng (Plasmid-DNA)
Vorwärtsprimer	20 pmol
Rückwärtsprimer	20 pmol
Pfu-Polymerase	in Abhängigkeit vom Hersteller
MgCl ₂	1 bis 4 mM (etabliert auf das Gen)
dNTPs	2,5 mM
ddH ₂ O	add 50 µL

Beispiel für ein Temperaturprogramm:

Initiale Denaturierung	95 °C, 10 min	
Denaturierung	95 °C, 1 min	} ca. 20 Zyklen
Primerhybridisierung	57 °C, 1 min	
Elongation	72 °C, abhängig von der Amplifikatlänge und der verwendeten Polymerase	
Abschließender Elongationsschritt	72 °C, 10 min	

3.2.7.2 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese ermöglicht den Austausch einzelner Nukleotide innerhalb eines DNA-Abschnittes. Hierzu werden komplementäre Vorwärts- und Rückwärtssequenzen mit einer oder mehreren ausgewechselten Nukleotiden erzeugt und das Konstrukt mittels PCR amplifiziert.

Beispiel für einen PCR-Ansatz zur Erzeugung einer ortsspezifischen Mutagenese:

Pfu-Polymerase	abhängig vom Hersteller
Pfu-Puffer (+ Mg ²⁺)	1-fach
Template	20 ng/µL
Vorwärtsprimer	20 pmol/µL
Rückwärtsprimer	20 pmol/µL
dNTPs	2,5 mM
ddH ₂ O	add 20 µL

Beispiel für ein Temperaturprogramm: siehe 3.2.7.1.

3.2.7.3 DpnI-Verdau

Der DpnI-Verdau diente dem Abbau der parenteralen DNA im Anschluss an eine ortsspezifische Mutagenese. Durch das Enzym wurde ausschließlich methylierte DNA

abgebaut. Eine Methylierung entstand erst durch den Produktionsorganismus, sodass die neu amplifizierte DNA vollständig erhalten blieb. Zu einem PCR-Ansatz wurden jeweils 1 µL DPNI hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.7.4 Restriktionsverdau

Das Einfügen von Genabschnitten in Plasmide erfolgte über Restriktionsendonukleasen. Diese erkannten eine spezifische Nukleotidsequenz von vier bis acht Basen in doppelsträngiger DNA. Abhängig vom verwendeten Enzym resultierten sogenannte klebrige oder glatte Enden, die komplementär im Genabschnitt zum Plasmid waren.

Die Durchführung der Restriktion und der anschließenden Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte nach Herstellerangaben.

Standardansatz:

DNA	0,75 bis 4 µg
Puffer	1x
Restriktionsenzym	1 bis 2 U
ddH ₂ O	add 20 µL

3.2.7.5 Aufreinigung eines Amplifikats

Das Kit DNA Clean & Concentrator™-5 der Firma Zymno Research fand zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von PCR-Amplifikaten Einsatz.

3.2.7.6 Gel-Extraktion

Eine Gelbande wurde im Recovery Kit der Firma Zymno Research eingesetzt und so die DNA gewonnen.

3.2.7.7 Ligation

Das Enzym DNA-Ligase diente der Verknüpfung doppelsträngiger DNA-Abschnitte. Das Insert wird im Überschuss in einem Verhältnis von 5:1 bzw. 3:1 zum Plasmid hinzugegeben. Die Ligation erfolgt ÜN bei RT.

Standardansatz:

Vektor (linearisiert)	100 bis 200 ng
Insert	im Verhältnis von 5:1 bzw. 3:1
T4 DNA-Ligase-Puffer	1x
T4 DNA-Ligase	1 µL
ddH ₂ O	add 20 µL

3.2.7.8 Transformation vektorieller DNA in kompetente Zellen nach der Hitzeschock-Methode
Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen des entsprechenden Stammes wurden 1 h auf Eis aufgetaut. Zunächst wurde 1 µg der zu transfizierenden DNA vorgelegt und anschließend mit 50 µL der kompetenten Zellen überschichtet. Unter leichtem Rühren wurde die Lösung gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Wasserbad erfolgte bei 42 °C für 30 sec der Hitzeschock. Im Anschluss an das Abkühlen auf 4 °C wurden 250 µL SOC-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37 °C und 1100 rpm geschüttelt. 100 µL dieser Lösung wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agar-Platten unter entsprechender Selektion ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C üN.

3.2.7.9 Plasmid-Isolierung aus *E.coli*-Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen wurde das E.Z.N.A™ Plasmid mini Kit I (Protokoll A1) verwendet. Eine Bakterienkolonie wurde von einer Agar-Platte in 5 ml einer Flüssigkultur transferiert und diese üN bei 37 °C und 150 rpm unter Selektionsdruck inkubiert. Die Plasmidkultur wurde im Weiteren aus dieser Vorkultur nach dem Standardprotokoll des Herstellers gewonnen.

3.2.7.10 Messung der DNA-Konzentration

Der DNA-Gehalt wurde anhand der optischen Dichte im NanoDrop Photometers (Peglab) photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Probe wurde durch das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ bestimmt, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

3.2.7.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Größen-basierten Separation von Nukleinsäurestränge, wobei die negativ geladene DNA entlang eines elektrischen Feldes zur Anode wandert.

Hierzu wurde ein 1,5%-iges Agarosegel in TAE-Puffer hergestellt und in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Zum Nachweis wurde dem Gel 10 µL/50 mL Midori Green beigesetzt.

Die Proben wurden in einem Verhältnis von 6:1 mit Auftragspuffer versetzt und 10 µL der Probe bzw. des Markers auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 105 V über ca. 50 min (abhängig vom gewünschten Trennergebnis). Die Banden wurden bei 366 nm detektiert.

3.2.7.12 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode (Inoue, Nojimab und Okayama, 1990)

TYM: 20g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, , 10 mM MgSO₄, 100 mM KCl

TfB1 (pH 5,8): 30 mM KOAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (w/v) Glycerin

TfB2 (pH 7,0): 10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% (w/v) Glycerin

Die entsprechende Zelllinie wurde in 5 mL Vorkultur aufgenommen und bei 37 °C üN unter Schütteln kultiviert. Die Vorkultur wurde in 250 mL TYM Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,6 inkubiert.

Im Anschluss an die Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 200xg wurde das Pellet in 50 ml kaltem TfB1-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei genannten Bedingungen wurde das Pelett in TfB2 auf Eis aufgenommen und aliquotiert.

3.2.7.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Vektor-DNA erfolgte unter Verwendung des Programmes Cycle clean and run (BIGDYE v 3.1) an der Ludwig Maximilian Universität in München. Hierzu wurden 150 bis 300 ng der Probe-DNA mit 3,2 pmol des Sequenzierprimers gemischt und mit 10 mM TRIS/HCl auf 7 µL aufgefüllt.

3.2.8 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des Programms GraphPad Prism. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde die nicht-lineare Regression mit einem Drei-Parameter-Fit durchgeführt.

Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein einfaktorieller ANOVA mit einem anschließenden Bonferroni's Multiple Comparison Test oder alternativ ein T-Test durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des Produktions- und Aufreinigungsverfahrens für das HDAC8-Protein

Zur Bereitstellung ausreichender Proteinmengen der HDAC8 sollte die Proteinproduktion von Dennis Wegener, beschrieben in seiner Dissertation aus dem Jahr 2004, etabliert und ggf. verbessert werden. Das eingesetzte System verwendete das Plasmid pQE70, das HDAC8 als Fusionsprotein mit einem His-Tag verbindet (siehe 3.1.4). Im Anschluss an die Expression in *E.coli* XL1-blue-Zellen erfolgte der Aufschluss per Ultraschall und die Aufreinigung unter Verwendung des IMAC-Verfahrens (siehe 3.2.6.2).

4.1.1 Expression des HDAC8-Proteins

4.1.1.1 Einfluss des Mediums auf die Produktionseffizienz

Broedel, Papciak und Jones wiesen im Jahr 2001 nach, dass LB-Medium trotz seines weit verbreiteten Einsatzes nicht immer das Kulturmedium der Wahl ist. So zeigten vier von sechs Medien einen höheren Biomasseertrag als LB-Medium. Aus diesem Grund sollte zunächst eine Korrelation zwischen der Art des Mediums und dem Biomasseertrag bzw. der HDAC8-Produktionsleistung hergestellt werden.

Hierfür sollten die beiden Medien 2YT sowie TB mit dem Standardmedium LB (Lysogeny Broth) hinsichtlich der Parameter OD₆₀₀ (siehe 3.2.2.2.2) und HDAC8-Aktivität (siehe 3.2.4.1) bezogen auf die Biomasse verglichen werden, wobei die Menge an Aufschlusspuffer auf die Biomasse angepasst wurde (siehe Abbildung 7). Sowohl 2YT- als auch TB-Medium wiesen einen höheren Nährstoffgehalt auf. Das 2YT-Medium besteht im Vergleich zu LB-Medium aus einer 2-fach erhöhten Hefeextraktmenge und 60% mehr Pepton. Dieses Medium findet insbesondere für Langzeitkultivierungszyklen Einsatz. TB-Medium enthält ebenfalls eine erhöhte Menge an Hefeextrakt und Pepton, wobei als zusätzliche Kohlenhydrat-Quelle Glycerol und Kaliumphosphat zur Stabilisierung des pH-Wertes beigefügt war.

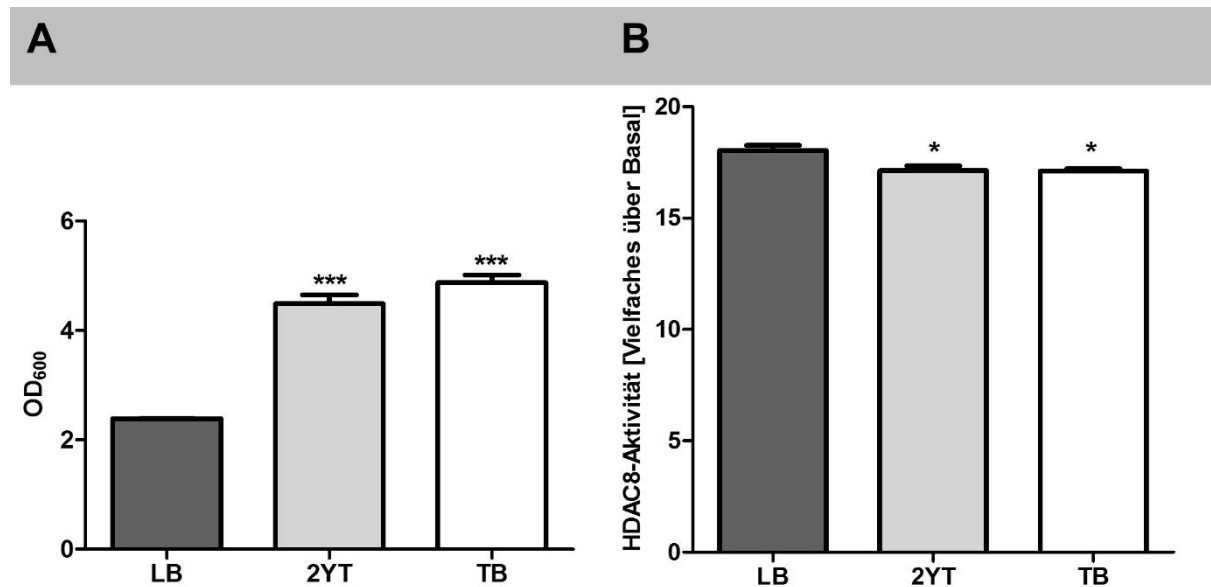


Abbildung 7: Vergleich der Nährmedien LB, 2YT sowie TB hinsichtlich Biomasseertrag und HDAC8-Menge.

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 1 L Hauptkultur der drei Nährmedien LB, TB sowie 2YT überführt (siehe 3.2.6.2.1). Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Die OD₆₀₀ wurde erfasst und die Biomasse pro Volumen eingestellt (siehe 3.2.2.2.2). Der Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) wurde unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) durchgeführt. Die Werte sind Mittelwert (mean) \pm SEM, n=3. *: $P < 0,05$, ***: $P < 0,001$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol). Die Normierung erfolgte auf die Negativkontrolle und diese wurde auf 1 gesetzt.

Das LB-Medium zeigte mit einer OD₆₀₀ von 2,4 eine signifikant abweichende Trübung zum 2YT- mit 4,5 bzw. zum TB-Medium mit 4,9 (siehe Abbildung 7A). Ein Vergleich der HDAC8-Aktivität im Zelllysate (siehe Abbildung 7B) von 18,04 Vielfaches über Basal bei einer Kultivierung in LB-Medium ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied zum Einsatz von 2YT- (17,1 Vielfaches über Basal) bzw. TB-Medium (17,1 Vielfaches über Basal).

4.1.1.2 HDAC8-Expression als unlösliches Protein

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob neben löslichem Protein auch ein gewisser Anteil in Einschlusskörperchen verpackt wird. Diese stellen eine Ansammlung an vollständig synthetisiertem, jedoch fehlerhaft gefaltetem Protein dar [Burgess *et al.*, 2009]. Im Anschluss an eine Kultivierung in LB-Medium (siehe 3.2.6.2.1) wurde die Einschlusskörperchen-Fraktion gewonnen (siehe 3.2.6.1.2) und HDAC8 in dieser immunologisch im Western Blot detektiert (siehe 3.2.2.4). Hier ergab sich eine deutlich nachweisbare Menge (Daten nicht gezeigt).

4.1.1.3 Stabilität von HDAC8 im Zelllysate und nach Aufreinigung

Im Anschluss an die rekombinante Expression des HDAC8-Proteins in *E.coli* XL1-blue-Zellen erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall in HDAC8-Puffer, ein 15 mM TRIS-Puffer bei pH 8,0

mit 3 mM MgCl₂, 10 mM KCl sowie 10% (v/v) Glycerol (siehe 3.2.6.2.1 und 3.2.6.2.2). Zunächst sollte die Stabilität des HDAC8-Proteins anhand der Aktivität im Zwei-Schritt-Aktivitätstest festgestellt werden (siehe 3.2.4.1, siehe Abbildung 8).

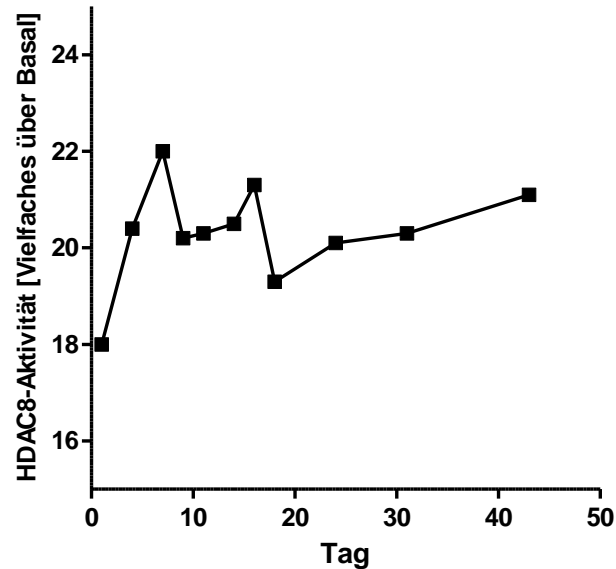


Abbildung 8: HDAC8-Stabilität im Zelllysat.

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 1L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Das Zelllysat wurde aliquotiert, bei 4 °C gelagert und periodisch auf die HDAC8-Aktivität (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) untersucht (n=1). Die Normierung erfolgte auf die Negativkontrolle und diese wurde auf 1 gesetzt.

Wie in Abbildung 8 dargestellt, zeigte das Zelllysat eine Erhöhung der Aktivität von 18,0-fach über Basal an Tag 0 auf 21,1-fach über Basal nach 43 Tagen bezogen auf die Negativkontrolle. Das Lysat kann folglich über einen Zeitraum von 40 Tagen eingesetzt werden.

Das IMAC-Verfahren sah die Trennung der Proteine bei Raumtemperatur vor. Aus diesem Grund sollte die Stabilität des Proteins über einen gewissen Zeitverlauf dokumentiert werden. Hierzu wurde die Aktivität an rekombinant hergestelltem und mittels IMAC-Verfahrens (siehe 3.2.6.2) gereinigter Probe nach einer Inkubationszeit von 16 bzw. 40 h bei RT mit einer bei 4 °C gelagerten Probe verglichen (siehe 3.2.4.1, Daten nicht gezeigt). Es konnte eine Abhängigkeit der Aktivität von der Inkubationszeit nachgewiesen werden. So war diese nach 16 h um das 0,37-fache und nach 40 h um das 0,97-fache gesenkt. Dies macht eine kurzfristige Lagerung bei RT und folglich die Aufreinigung möglich, jedoch sollte die Kühlung der einzelnen Fraktionen sichergestellt werden.

4.1.1.4 Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die HDAC8-Aktivität

Nach einer unvollständigen Aufreinigung sind neben dem Zielprotein noch weitere Proteine vorhanden. Diese können ggf. auch zur Klasse der Proteasen gehören. Aus diesem Grund wurde einer Fraktion nach Aufreinigung das Gemisch aus Proteaseinhibitoren Complete zugesetzt. Zur Vermeidung einer Komplexbildung des Zink-Ions aus dem Aktivzentrum der HDAC8 wurde EDTA-freies Complete verwendet. Der Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) ergab, dass der Zusatz von Complete zu einer direkten Reduktion der Aktivität um das 0,44-fache führte. Eine Zeit-aufgelöste Erfassung der Aktivität nach 16 bzw. 40 h Inkubation ist in Abbildung 9: Einfluss des Proteaseinhibitor-Gemisches Complete auf die HDAC8-Aktivität dargestellt.

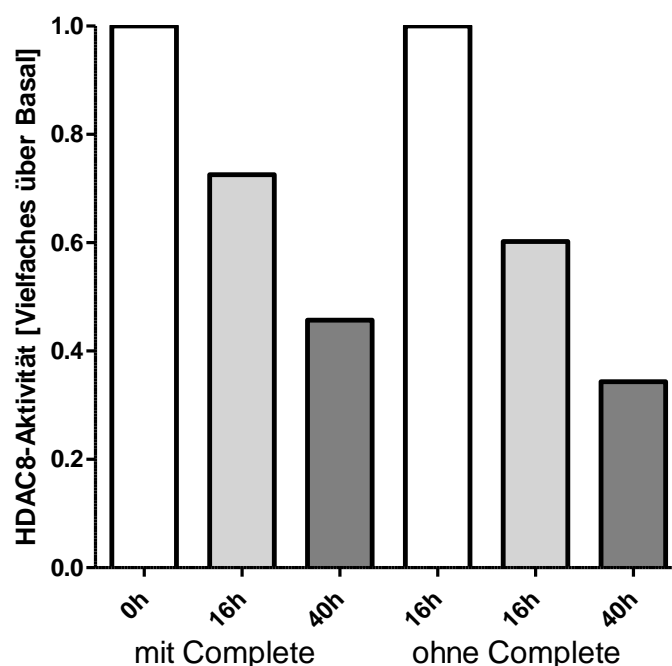


Abbildung 9: Einfluss des Proteaseinhibitor-Gemisches Complete auf die HDAC8-Aktivität.

Einer per IMAC-Verfahren aufgereinigte Charge an HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2) wurde 1x Complete ohne EDTA zugesetzt und die Aktivität zu Beginn (0 h), nach 16 h sowie nach 40 h im Zwei-Schritt-Aktivitätstest unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) untersucht (siehe 3.2.4.1). Die Ergebnisse wurden auf die Aktivität der jeweiligen Ausgangslösung normiert und diese auf 1 gesetzt ($n=1$).

Beide Ansätze wiesen eine Reduktion der HDAC8-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer auf. Im vorangegangenen Versuch zeigte sich nach 40 h Inkubationszeit eine Restaktivität von 0,03-fach. Davon abweichend konnte hier mit 0,46-fach (mit Complete) bzw. 0,34-fach (ohne Complete) eine höhere Aktivität nachgewiesen werden. Da der kostenintensive Einsatz von Complete zu einer Reduktion der HDAC8-Aktivität und keiner deutlichen Stabilisierung über die Zeit führte, sollte die Proteaseinhibierung nicht erfolgen.

4.1.1.5 Einfluss des Kations auf die Trenngüte des IMAC-Verfahrens

Zur Etablierung des Verfahrens wurde eine Säule mit Nickel, Kobalt- sowie Zink-Ionen beladen, 20 mL Zelllysate aufgegeben und stufenweise mit 40, 60, 100, 200 sowie 500 mM Imidazol eluiert (siehe Abbildung 10).

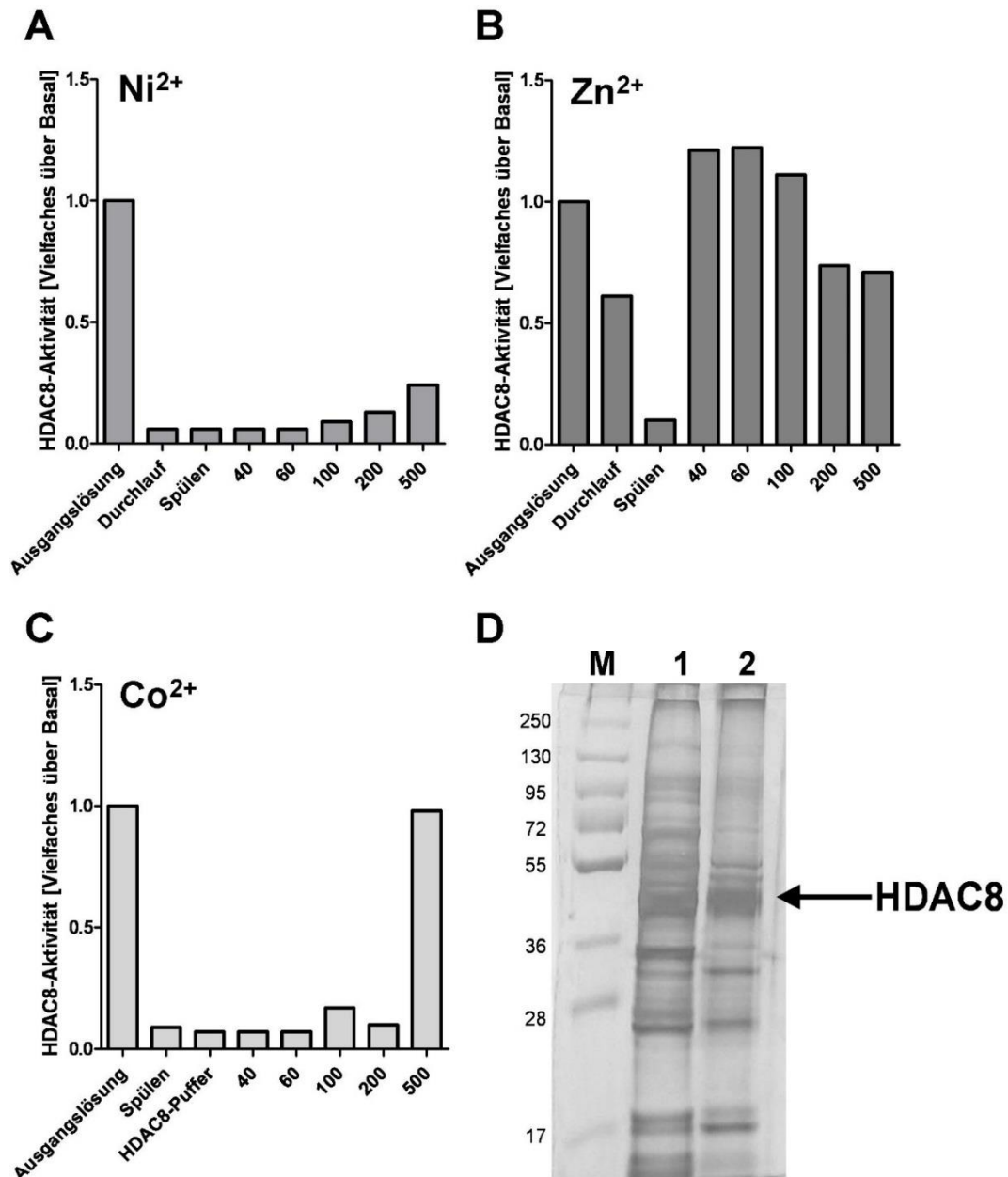


Abbildung 10: Einfluss des eingesetzten Kations auf das Aufreinigungsverfahren.

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft, üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm inkubiert und anschließend in 1L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Zur IMAC-Aufreinigung wurden eine Säule mit den Ionen Ni²⁺ (A), Zn²⁺ (B) bzw. Co²⁺ (C) beladen, 20 mL des Zelllysates aufgegeben und stufenweise mit 40, 60 100, 200 und 500 mM Imidazol eluiert (siehe 3.2.6.2.3). Die HDAC8-Aktivität (n=1) wurde unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) erfasst (siehe 3.2.4.1). Die Normierung erfolgte auf die Ausgangslösung und diese wurde auf 1 gesetzt. In einer 12,5%-igen SDS-PAGE (D) mit anschließender Silberfärbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.3) wurden der Unstained Marker (M), die Ausgangslösung (1) sowie die Spitzenfraktion der Elution bei 500 mM Imidazol (2) aus C separiert und nachgewiesen.

Die Ionen Nickel, Kobalt und Zink zeigten ein unterschiedliches Elutionsverhalten. So konnte bei Einsatz von Ni^{2+} -Ionen ab 100 mM Imidazol eine HDAC8-Aktivität von 0,1-fach über Basal festgestellt werden, wobei diese mit zunehmender Imidazolkonzentration anstieg (siehe Abbildung 10). Es konnte jedoch nach Elution mit 500 mM Imidazol maximal eine Aktivität von 0,2-fach über Basal detektiert werden. Die HDAC8-Aktivität des Durchlaufs sowie des Spülens betrug jeweils 0,1-fach über Basal.

Die HDAC8-Elution bei Einsatz von Zink-Ionen wies hingegen bei den Konzentrationen 40 und 60 mM Imidazol mit jeweils 1,2-fach über Basal die höchste Aktivität auf, wobei diese mit steigender Imidazolkonzentration abnahm (siehe Abbildung 10). Im Durchlauf wurde eine HDAC8-Aktivität von 0,6-fach über Basal festgestellt werden.

Der Einsatz von Kobalt-Ionen führte zum Nachweis einer HDAC8-Menge nach Elution mit 500 mM von 1,0-fach über Basal eine HDAC8-Aktivität auf Höhe der Aktivität der Ausgangslösung (siehe Abbildung 10). Die SDS-PAGE im Anschluss an die Aufreinigung wurde in der SDS-PAGE mit darauf folgender Silberfärbung detektierten weitere Banden neben dem HDAC8-Protein (siehe Abbildung 10), welche den hohen Verunreinigungsgrad nachweisen.

4.1.1.6 Steigerung der Aufreinigungsqualität im IMAC-Verfahren

Der Einsatz von Co^{2+} - bzw. Zn^{2+} -Ionen im IMAC-Verfahren führte zu einem unzureichenden Aufreinigungsergebnis (siehe 4.1.1.5). Da jedoch der Einsatz von Ni^{2+} -Ionen in einer Reduktion der HDAC8-Aktivität resultierte, wurde zunächst eine Aufreinigungsstrategie mit Co^{2+} -Ionen verfolgt. Die Variation verschiedenster Parameter führte jedoch nicht zu einer ausreichenden Verbesserung des Trennergebnisses (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde der Einsatz von Ni^{2+} -Ionen weiter verfolgt, jedoch wurde zur Reduzierung der Austauschwahrscheinlichkeit den Ions aus dem Aktivzentrum ein zeitverkürztes Verfahren unter Einsatz einer Peristaltikpumpe gewählt.

4.1.1.6.1 Die Ammoniumsulfatfällung zur HDAC8-Aufreinigung

Zur Verbesserung der Aufreinigung sollte zunächst die Proteingesamtmenge reduziert werden. Das klassische Verfahren der Ammoniumsulfatfällung sieht die Fällung des Zielproteins bei einer bestimmten Sättigung an Ammoniumsulfat vor. Hierdurch lag das Zielprotein jedoch inaktiv vor und musste durch Dialyse regeneriert werden. Da jedoch bei HDAC8 der vollständige Aktivitätsverlust nicht behoben werden konnte (Daten nicht gezeigt) wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, die Aktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt und der Gesamtproteingehalt ermittelt (siehe 3.2.6.2.3, siehe Abbildung 11).

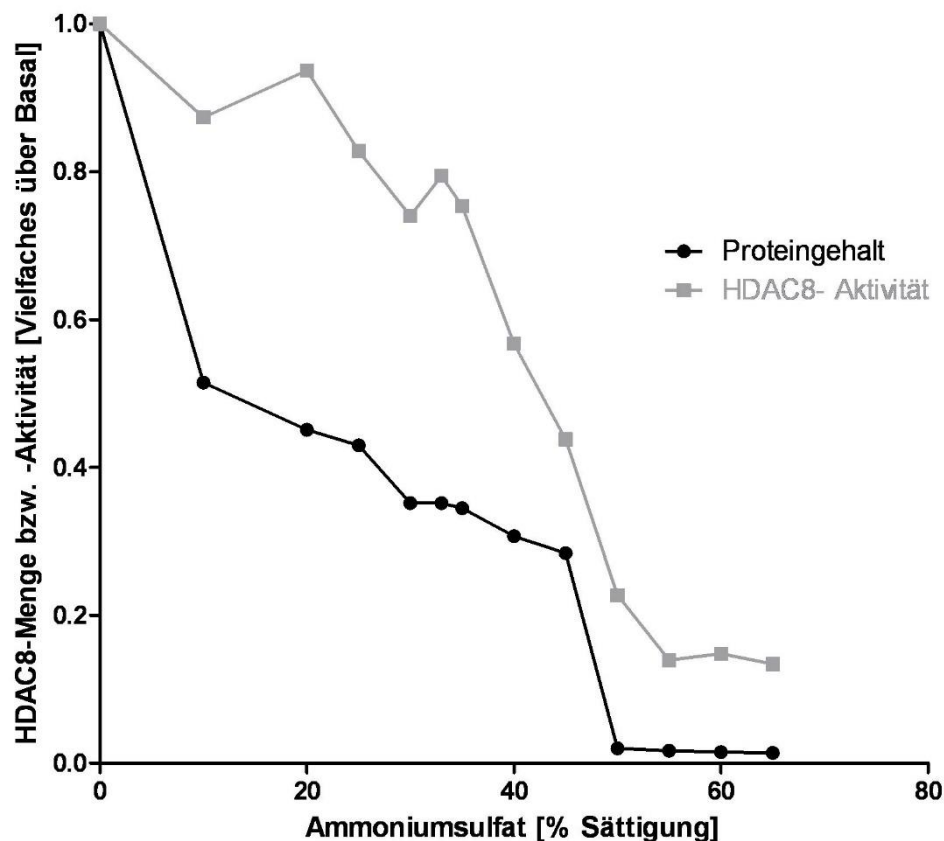


Abbildung 11: Einfluss der Ammoniumsulfatkonzentration auf die HDAC8-Aktivität und den Proteingehalt in Lösung.

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 1L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Die Charge wurde aufgeteilt, verschiedene Konzentrationen an Ammoniumsulfat in einem Zeitintervall von 20 min hinzugegeben, die Protein 30 min gefällt und die Akkumulate vom Überstand getrennt (12.000xg, 15 min, 4 °C; siehe 3.2.6.2.3). Der Überstand wurde im Zwei-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) und im BCA-Test (siehe 3.2.2.1) eingesetzt. Die Aktivität (■) und der Proteingehalt (●) wurde auf den Ausgangswert normiert und dieser auf 1 gesetzt (n=1).

Der Proteingehalt nahm mit steigender Ammoniumsulfatsättigung ab. So wurde bei einer Sättigung von 25% eine Proteinmenge von 0,57-fach über Basal gefällt und bei 55% waren keine Proteine mehr nachweisbar (siehe Abbildung 11). Die HDAC8-Aktivität hingegen zeigte eine erste Reduzierung zunächst bei einer Sättigung von 25% um das 0,17-fache, bei einer Sättigung von 55% um das 0,86-fache und mit steigender Ammoniumsulfatmenge keine weitere Abnahme der Aktivität. Für die folgenden Versuche wurde eine Ammoniumsulfatsättigung von 25% eingesetzt.

4.1.1.6.2 Einsatz von Imidazol zu Steigerung der Trenngüte

Die Aufreinigung unter Einsatz des IMAC-Verfahrens mit vorangegangener Ammoniumsulfatfällung bei einer Sättigung von 25% ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Trennstrecke wurde auf 5 mL Säulenvolumen erhöht und die Chromatographie mit Hilfe einer

Peristaltikpumpe durchgeführt. Zur Reduzierung von unspezifischen Proteinassoziationen wurde die Säule mit 30 mL 25 mM Imidazol in HDAC8-Puffer äquilibriert werden. Das Auftragsvolumen des Zelllysates betrug 20 mL, wobei anschließend mit 20 mL 25 mM Imidazol gespült wurde. Der Gradient erfolgte mit einem Volumen von 30 mL a 2 mL Fraktionen von 0 bis 1 M Imidazol/HDAC8-Puffer/ 10% (v/v) Glycerol. Des Weiteren sollten der Einfluss einer Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 40 mM zum Äquilibrieren sowie zum Spülen und von Imidazol im Zellysepuffer auf das Trennergebnis untersucht werden. Die HDAC8-Aktivität der Chromatographieproben wurde anschließend erfasst (siehe 3.2.4.1), wobei die Proteine der entsprechenden Fraktionen in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) nachgewiesen wurden.

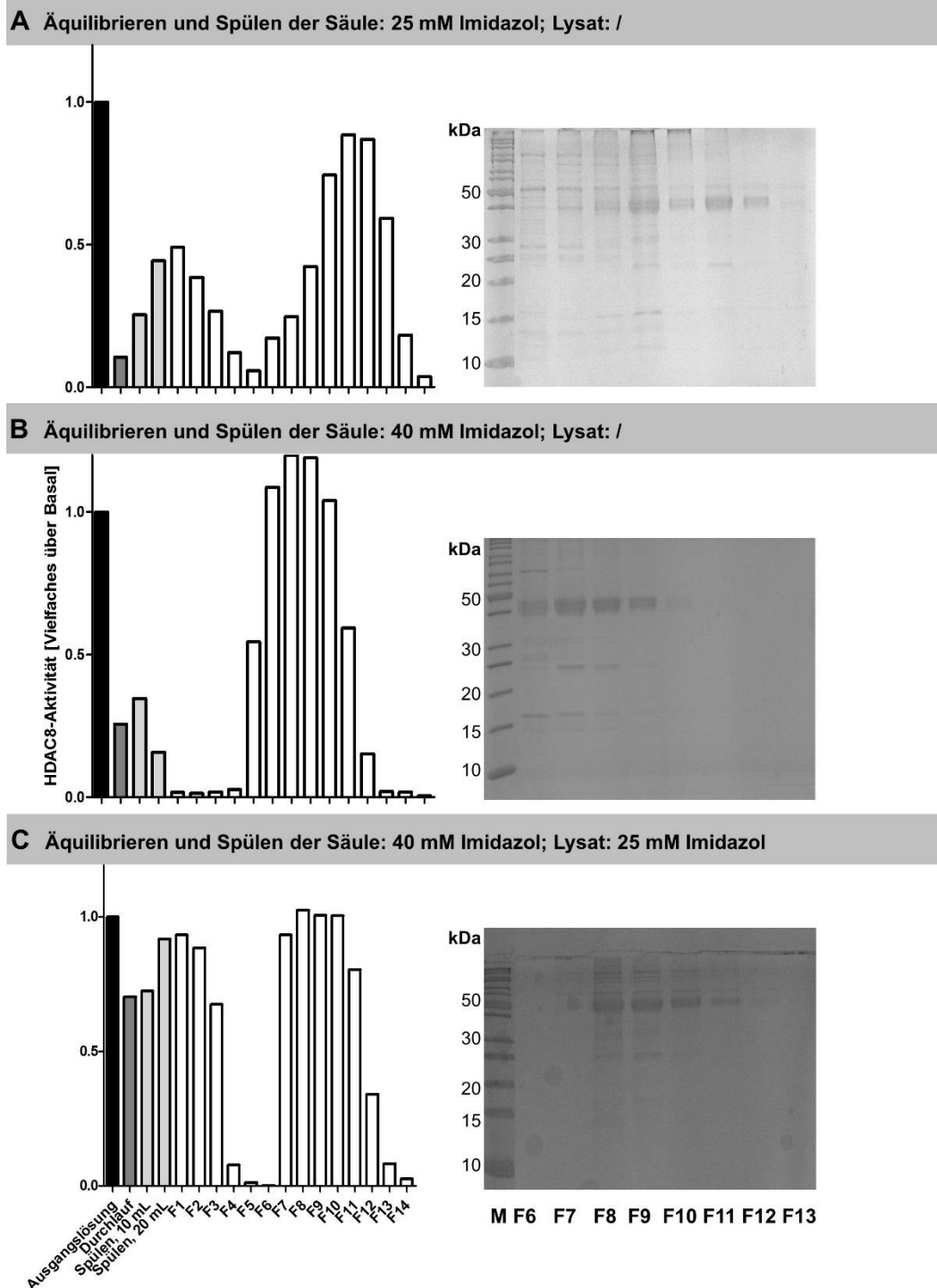


Abbildung 12: Variation der Imidazolmenge im IMAC-Verfahren zur HDAC8-Aufreinigung.

Eine Vorkultur an *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) wurde nach einer $\bar{u}N$ -Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 4 L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer $\bar{u}N$ -Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 25% Sättigung durchgeführt (siehe 3.2.6.2.3) und 30 mL des Lysats im IMAC-Verfahren eingesetzt. Zum Äquilibrieren und Spülen der Säule wurde eine 25 mM (A) bzw. eine 40 mM (B, C) Imidazol-Lösung in HDAC8-Puffer eingesetzt. Dem Lysat wurde in (C) zusätzlich eine Imidazolkonzentration von 25 mM hinzugegeben. Der Überstand wurde im Zwei-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340$ nm / $\lambda_{EX} = 460$ nm) eingesetzt (links) und die Reinheit in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) erfasst (rechts). Die Aktivität wurde auf die Ausgangslösung normiert und diese auf 1 gesetzt (n=1).

Der Einsatz von 25 mM Imidazol in HDAC8-Puffer zum Äquilibrieren und Spülen der Säule nach der Probenaufgabe führte zu einer HDAC8-Aktivität in den Fraktionen F7 bis F13, wobei die maximale Aktivität mit 0,89-fach über Basal in F10 detektiert wurde (siehe Abbildung 12A). Im Durchlauf wurde mit 0,15-fach über Basal eine der Negativkontrolle entsprechende Aktivität nachgewiesen. Die beiden Spülschritte mit 25 mM Imidazol führte zunächst zu einer Erhöhung der Aktivität auf 0,25- und anschließend auf 0,44-fach über Basal.

Im Vergleich hierzu führte der Einsatz von 40 mM Imidazol zu einer Erhöhung der HDAC8-Menge im Durchlauf auf 0,26-fach über Basal, jedoch zu einer Verringerung während der beiden Spülschritte auf 0,35- bzw. 0,16-fach über Basal (siehe Abbildung 12B). Die Aktivität während der Elution erstreckte sich auf die Fraktionen 5 bis 11 und lag im Vergleich zum Einsatz von 25 mM Imidazol bei einer geringeren Menge an Imidazol. Die maximale Aktivität von 1,20-fach lag in Fraktion F7 vor.

Nach dem Hinzufügen von 25 mM Imidazol zum Zelllysats nahm die HDAC8-Aktivität im Durchlauf und in den beiden Spülschritten auf 0,70-, 0,73- bzw. 0,92-fach über Basal zu (siehe Abbildung 12C). Die Fraktionen 1 bis 3 wiesen ebenfalls eine Aktivität auf. Die HDAC8-Anfangsaktivität hingegen war nicht beeinflusst. Die Hauptmenge an HDAC8 konnte hier in den Fraktionen F7 bis F11 nachgewiesen werden.

Die Trennung der einzelnen Fraktionen mit einer HDAC8-Aktivität in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wies auf Höhe von ca. 45 kDA eine starke Bande nach, jedoch konnten in allen drei Experimenten weitere Banden oberhalb und unterhalb des HDAC8-Proteins detektiert werden. Durch die Erhöhung der Imidazolmenge wurde eine Reduzierung der unspezifischen Banden erreicht. Der Einsatz von Imidazol im Zelllysats führte nicht zu einer Verbesserung des Trennergebnisses.

Als weiteres Experiment wurde das Elutionsverfahren geändert. Hier erfolgte die Elution nicht durch eine Substitution des Proteins durch Imidazol, sondern die Bindung des His-Tags wurde durch eine pH-Wert-Änderung herabgesetzt. Hierfür wurde das Zelllysats in MES-Puffer bei pH 6,0 aufgenommen und die Elution mit Hilfe eines Gradienten gegen den HDAC8-Puffer (pH 8,0) durchgeführt (siehe 3.2.6.2.3, siehe Abbildung 13).

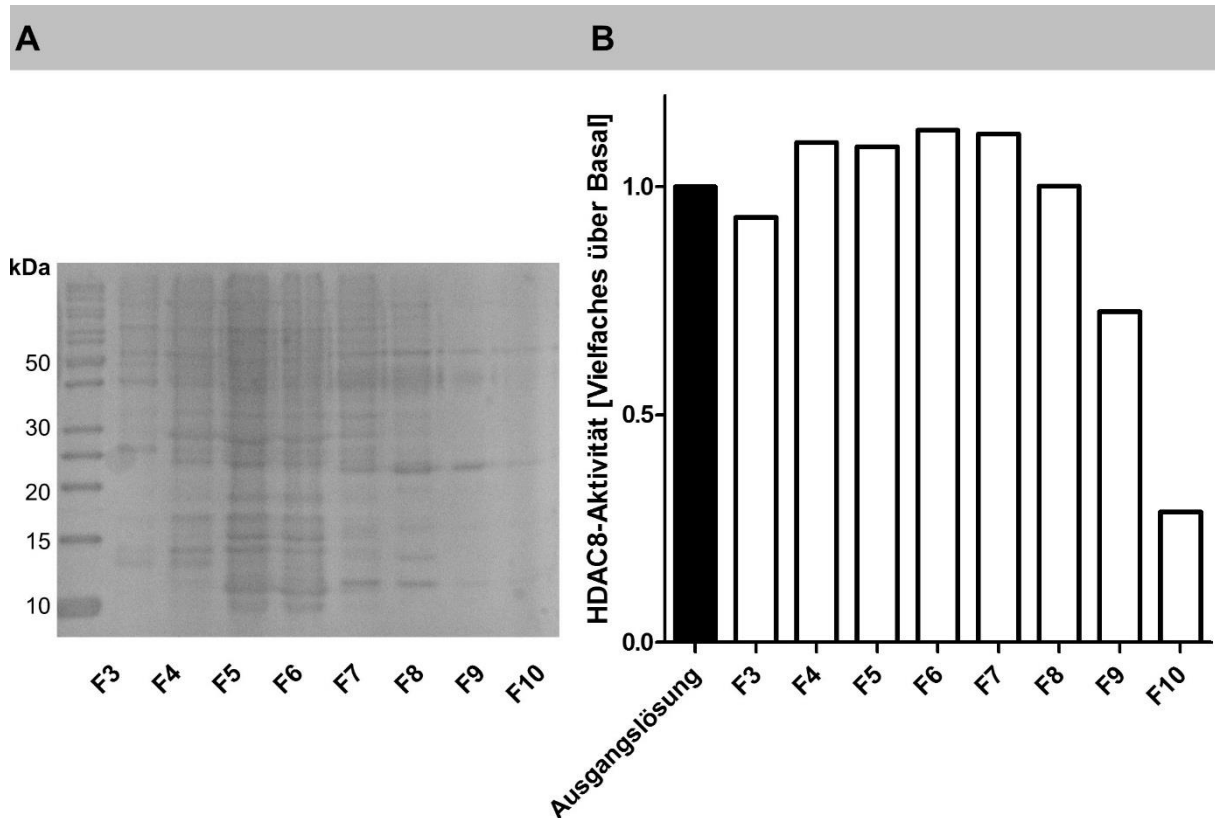


Abbildung 13: Verschiebung des pH-Wertes zur Elution des HDAC8-Proteins im IMAC-Verfahren. Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer ÜN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 4 L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer ÜN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall in MES-Puffer (pH-Wert 6,0; siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 25% Sättigung durchgeführt und 30 mL des Lysats im IMAC-Verfahren eingesetzt. Zum Äquilibrieren und Spülen der Säule wurde MES-Puffer (pH 6,0) verwendet. Die Elution wurde durch die Verschiebung des pH-Wertes mit Hilfe eines Gradienten gegen HDAC8-Puffer (pH 8,0) durchgeführt. Der Überstand wurde im Zwei-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) eingesetzt (B) und die Reinheit in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) erfasst (A). Die Aktivität wurde auf die Ausgangslösung normiert und diese auf 1 gesetzt (n=1).

Es konnte sowohl im Durchlauf mit 0,71-, als auch im ersten Spülschritten mit 0,52-fach über Basal eine HDAC8-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Hauptaktivität während der Elution lag in den Fraktionen 3 bis 10 vor (siehe Abbildung 13). Die maximale Aktivität konnte in Fraktion F6 mit 1,12-fach über Basal nachgewiesen werden. Die Auftrennung in der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wies neben der HDAC8-Bande bei 45 kDa weitere Banden oberhalb und unterhalb des HDAC8-Proteins nach.

4.1.1.6.3 Untersuchung einer additiven Anionenaustauschchromatographie zum IMAC-Verfahren zur Verbesserung der Aufreinigungsqualität des HDAC8-Proteins

Die Anionenaustauschchromatographie stellt neben dem IMAC-Verfahren eine Methode zur Trennung von Proteingemischen dar. Hierzu wurde zunächst die Trennleistung von 5 mL Fractogel EMD TMAE-650 (M) mit 30 mL Zelllysat untersucht, wobei die Elution stufenweise

mit 50, 100, 200, 500 sowie 1000 mM NaCl erfolgte (siehe 3.2.6.2.3). Es wurde jeweils die HDAC8-Aktivität im Zwei-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) und die Reinheit in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) bestimmt (siehe Abbildung 14).

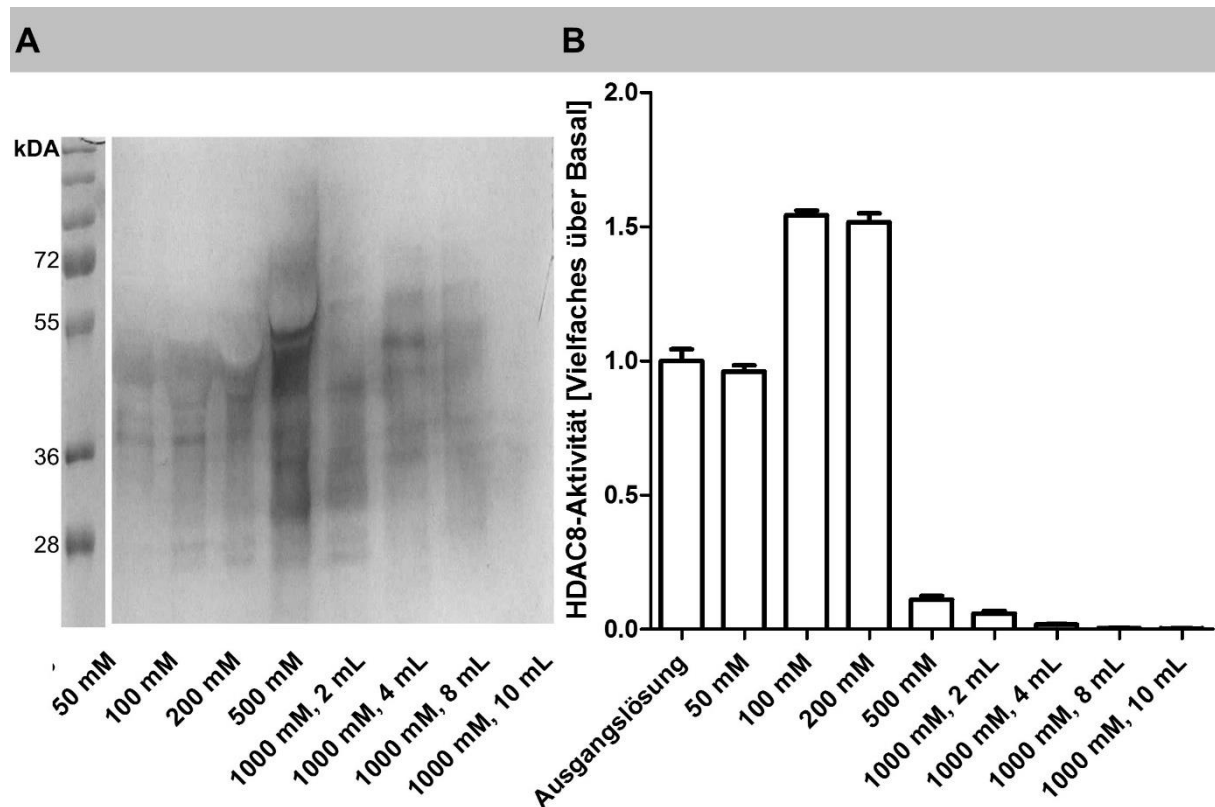


Abbildung 14: Anionenaustauschchromatographie zur HDAC8-Aufreinigung.

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 4 L LB-Medium überführt (siehe 3.2.6.2.3). Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss (siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit 5 mL Fractogel EMD TMAE-650 (M) und 30 mL Zelllysat durchgeführt. Die Elution erfolgte stufenweise mit 50, 100, 200, 500 sowie 1000 mM NaCl (siehe 3.2.6.2.3). Der Überstand wurde im 2-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys (TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) eingesetzt (B) und die Reinheit in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung erfasst (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2; A). Die Werte sind Mittelwert (mean) \pm SEM, n=3 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol). Die Normierung erfolgte auf die Ausgangslösung und diese wurde auf 1 gesetzt.

Der Aktivitätstest ergab einen HDAC8-Nachweis in den Fraktionen 50, 100 sowie 200 mM NaCl, wobei die höchste Konzentration bei der Elution mit 100 mM NaCl mit 1,54-fach über Basal höher lag als die Ausgangslösung (siehe Abbildung 14). Die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung ergab keine Auftrennung der Banden, sodass das HDAC8-Protein nicht eindeutig nachweisbar war. Im Vergleich zum IMAC-Verfahren ist die Aufreinigungsqualität herabgesetzt.

Des Weiteren wurde die Möglichkeit einer HDAC8-Aufreinigung durch eine additive, nachgeschaltete Anionenaustauschchromatographie an das IMAC-Verfahren geklärt. Es wurden hierfür aktive und nicht vollständig reine Fraktionen einer IMAC vereinigt und in einer Anionenaustauschchromatographie unter genannten Bedingungen eingesetzt (siehe 3.2.6.2.3). Es zeigte sich im Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) zwar eine Aufkonzentrierung auf 1,13-fach über Basal im Vergleich zur Ausgangslösung, jedoch konnte keine Steigerung der Reinheit erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.1.7 Standardverfahren

Vorangegangene Experimente führten nicht zu einer ausreichenden Trenngüte. Aus diesem Grund wurde in der Ammoniumsulfatfällung die Sättigung von 25 auf 40% erhöht. Zur Erhöhung der Bindungsaffinität der HDAC8 an das Säulenmaterial wurde zum Äquilibrieren ein HDAC8-Puffer ohne Imidazol verwendet. Des Weiteren wurde das Volumen des Spülschritts mit 40 mM Imidazol/HDAC8-Puffer/10% (v/v) Glycerol von 20 mL auf 5 mL erhöht. Es wurden 30 mL Zelllysate aus *E.coli* XL1-blue, transformiert mit pQE70-HDAC8, gefällt und anschließend unter genannten Bedingungen im IMAC-Verfahren eingesetzt. Der Gradient erfolgte mit 50 mL von 0 bis 1 M (siehe 3.2.6.2). In Abbildung 15 sind exemplarisch die Reinheit, der Proteingehalt sowie die HDAC8-Aktivität der drei Vereinigungen HDAC8-1 (rein, hohe Konzentration; F12-16), HDAC8-2 (rein, niedrige Konzentration; F17-20) sowie HDAC8-3 (unrein, niedrige Konzentration; F6-11) dargestellt.

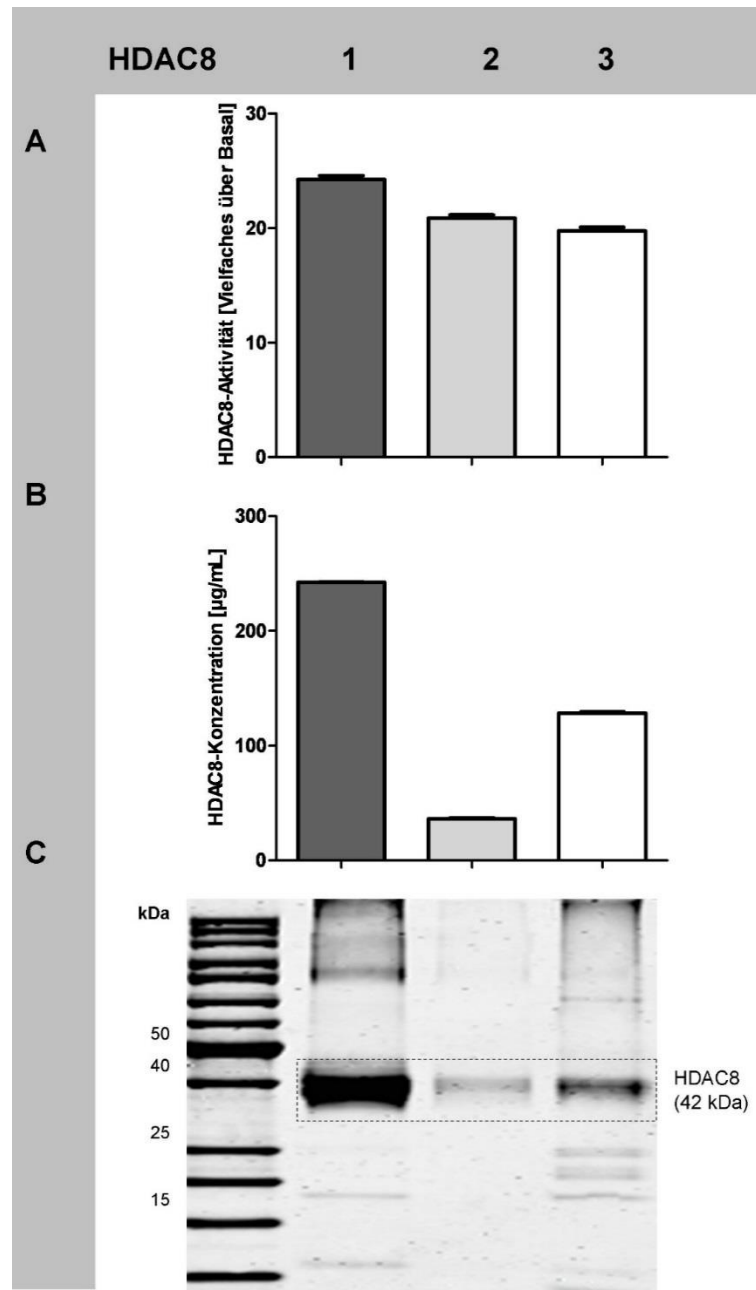


Abbildung 15: Reinheit und Konzentration nach einer HDAC8-Aufreinigung (Standardverfahren).

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 4 L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 40% Sättigung durchgeführt. Im Anschluss an das Äquilibrieren der Säule mit HDCA8-Puffer wurden 30 mL des Lysats im IMAC-Verfahren eingesetzt, unspezifische Bindungen mit 50 mL 40 mM Imidazol in HDCA8-Puffer reduziert und HDAC8 mit einem 50 mL Gradienten von 0 bis 1 M Imidazol in HDCA8-Puffer eluiert (siehe 3.2.6.2.3). Die Fraktionen wurden auf Basis ihrer Konzentration und Reinheit zu den Vereinigungen HDAC8-1 (hohe Konzentration, hohe Reinheit), HDAC8-2 (niedrige Konzentration, hohe Reinheit) sowie HDAC8-3 (niedrige Konzentration, niedrige Reinheit) vereinigt. Diese wurde im Zwei-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) eingesetzt (B), der Proteingehalt im BCA-Test (siehe 3.2.2.2.1) bestimmt (A) und die Reinheit in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) erfasst (C). Die Werte sind Mittelwert (mean) \pm SEM, $n=3$ im Aktivitätstest und $n=2$ im BCA-Test (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol). Die Normierung erfolgte auf die Ausgangslösung und diese wurde auf 1 gesetzt.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wies die Vereinigung HDAC8-1 mit einer Aktivität von 24,20-fach über Basal und einer Konzentration von 242,3 µg/mL eine hohe Reinheit auf. Sowohl HDAC8-2 als auch HDAC8-3 besaßen hingegen eine erniedrigte Konzentration von 36,2 bzw. 128,3 µg/mL, wobei letztere Vereinigung auch eine geringere Reinheit aufwies. Dieses Verfahren wurde für alle nachfolgenden Experimente verwendet.

4.1.2 Die Stabilisierung des HDAC8-Proteins zur Lagerung

4.1.2.1 Das Lyophilisieren des HDAC8-Proteins zur Steigerung

Die Lagerung des HDAC8-Proteins führt zum Aktivitätsverlust. Neben einer Proteolyse kann auch eine Stabilitätsminderung einhergehend mit dem partiellen Verlust der Konformation Ursache sein. Ein einfacher Schritt, um die Lagerdauer eines Proteins zu erhöhen, ist das Lyophilisieren. Dies stellt ein Verfahren zur schonenden Trocknung von Proteinen dar.

Zunächst wurde das Temperaturspektrum im Vergleich zu 4.1.1.3 um die Temperaturen 37 °C, 23 °C, -20 °C sowie -80 °C erweitert. Des Weiteren sollte die Lyophilisierbarkeit unter Einsatz der beiden Zucker Trehalose sowie Sucrose untersucht werden (siehe Abbildung 16:

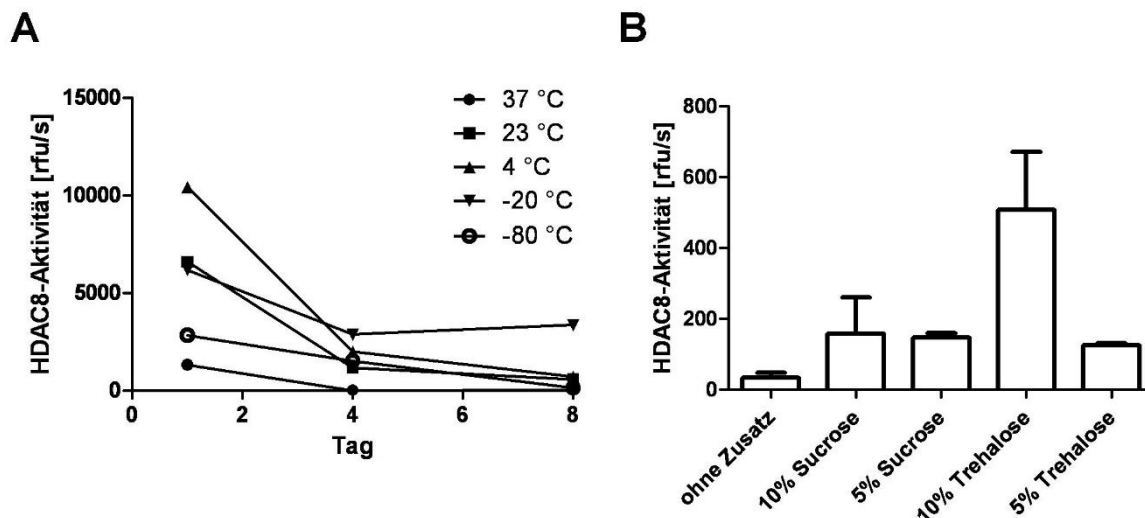


Abbildung 16: HDAC8-Aktivität nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (A) sowie im Anschluss an den Lyophilisiervorgang (B).

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue (transformiert mit pQE70-HDAC8) üN-Inkubation bei 37 °C, 450 rpm und in 4 L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 40% Sättigung durchgeführt. 30 mL des Lysats wurden im IMAC-Verfahren eingesetzt, unspezifische Bindungen mit 50 mL 40 mM Imidazol in HDCA8-Puffer reduziert und HDAC8 mit einem 50 mL Gradient von 0 bis 1 M Imidazol in HDAC8-Puffer eluiert (siehe 3.2.6.2.3). Die Fraktionen wurden auf Basis ihrer Konzentration, Aktivität und Reinheit (siehe 3.2.2.2.1, 3.2.4.1, 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) vereinigt. A Diese wurden bei den Temperaturen 37 °C (●), 23 °C (■), 4 °C (▲), -20 °C (▼) sowie -80 °C (○) gelagert und die Aktivität (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) periodisch erfasst. B Der Vereinigung wurde neben 10% Glycerol Saccharose bzw. Trehalose in den beiden Konzentrationen 5% sowie 10% beigelegt und die Proben lyophilisiert. Zur Erfassung der Aktivität (siehe 3.2.4.1) wurden die Proben in einem Äquivalent an ddH₂O aufgenommen. Die Werte sind Mittelwerte (mean)±SEM, n=2 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol).

Nach 24 h bei einer Lagertemperatur von 4 °C lag die HDAC8-Aktivität mit 10414 rfu/s höher im Vergleich zu den Temperaturen 23 °C sowie -20 °C. Hier waren die Aktivitäten mit 6577 bzw. 6163 auf 63 bzw. 59% gesenkt. Eine Lagerung bei -80 °C resultierte in einer Verringerung der Aktivität auf 27% mit 2800 rfu/s. Neben der Temperatur nahm auch die Zeit einen Einfluss. So sank die Aktivität bei allen untersuchten Temperaturen auf nahezu den Basalwert ab, wobei nach 8 Tagen bei 4 °C und – 20 °C die HDAC8-Aktivität mit 697 bzw. 3350 rfu/s am höchsten lag (siehe Abbildung 16: A).

Die HDAC8-Aktivität wurde während des Lyophilisierschrittes in der Kontrollprobe (ohne Zusätze) auf 33 rfu/s reduziert (siehe Abbildung 16B). Der negative Einfluss des Gefriertrocknens wurde durch den Zusatz von Zuckern reduziert. So sank die Aktivität nach Zusatz von 10% Trehalose auf 507 und von 5% auf 125 rfu/s. Die Zugabe von Saccharose führte zu einer Aktivität von 147 bei 5% und 158 bei 10%.

4.1.2.2 Steigerung der HDAC8-Lagerbarkeit durch Zugabe von Additiven

Zur Steigerung der Lagerbarkeit wurden die Vereinigungen HDAC8-1, HDAC8-2 sowie HDAC8-3 aus 4.1.1.7 aliquotiert und der Einfluss der Additive Sucrose, PMSF sowie Harnstoff auf die HDAC8-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Zwei-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) periodisch erfasst (siehe Abbildung 17).

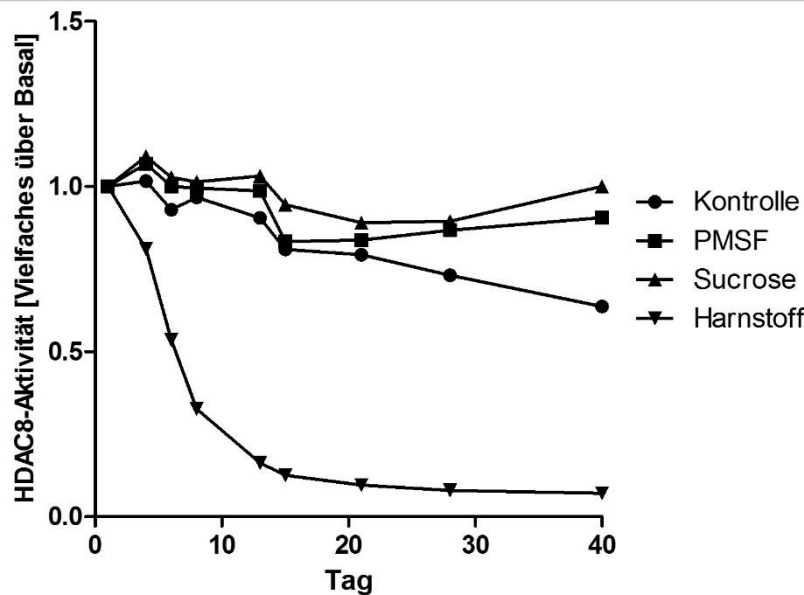
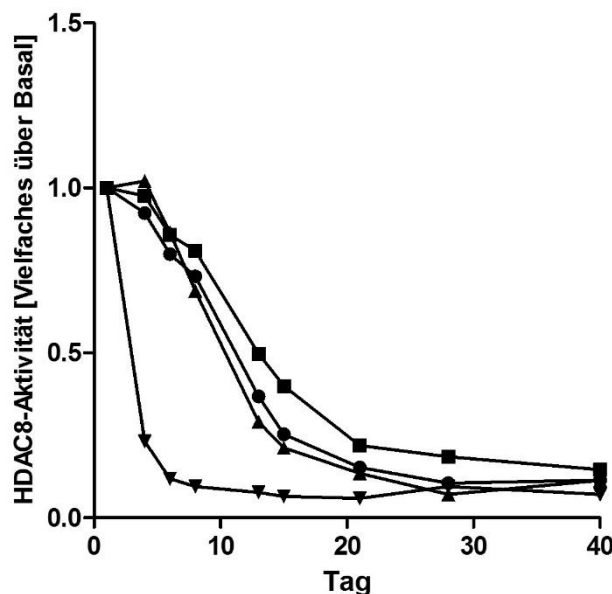
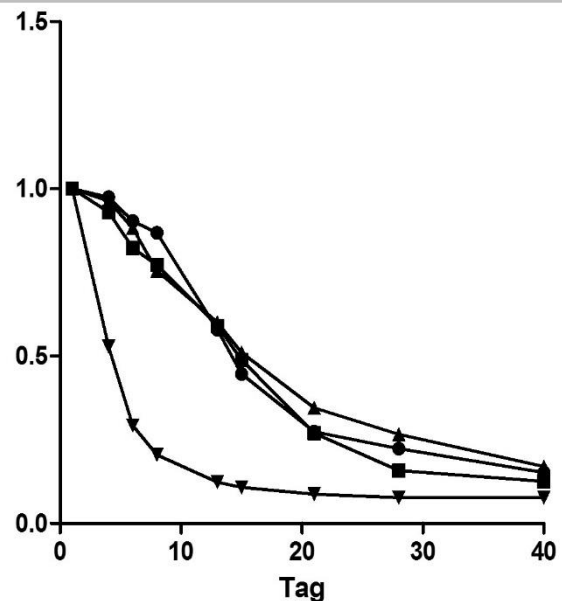
A HDAC8-1**B HDAC8-2****C HDAC8-3**

Abbildung 17: Einfluss der Additive PMSF, Sucrose sowie Harnstoff auf die HDAC8-Stabilität.

Den HDAC8-Vereinigungen HDAC8-1 (A: hohe Konzentration, hohe Reinheit), HDAC8-2 (B: niedrige Konzentration, hohe Reinheit) sowie HDAC8-3 (C: niedrige Konzentration, niedrige Reinheit) aus 4.1.1.7 wurden 0,1 mM PMSF, 1 M Sucrose sowie 1 M Harnstoff hinzugefügt und die Proben bei 4 °C gelagert. Die HDAC8-Aktivität wurde periodisch über einen Zeitraum von 40 Tagen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) gemessen (siehe 3.2.4.1). Die Werte sind Mittelwert (mean) \pm SEM, n=3 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das verwendete Symbol). Die Normierung erfolgte auf die Ausgangskonzentration und diese wurde auf 1 gesetzt.

Der Stabilitätsverlauf zeigte nach 40 Tagen für die Vereinigung HDAC8-1 (siehe Abbildung 17A), welche eine Gesamtproteinkonzentration von 242,0 $\mu\text{g/mL}$ besaß, einen Verlust um 0,38-fach über Basal bezogen auf die ursprüngliche Aktivität. Die Aktivität der Vereinigungen HDAC8-2 (36,0 $\mu\text{g/mL}$, siehe Abbildung 17B) bzw. -3 (128,0 $\mu\text{g/mL}$, siehe Abbildung 17C) mit

eine geringeren Konzentration wiesen beide einen erhöhten Verlust um 0,93- bzw. 0,89-fach über Basal auf.

Der Einsatz des Harnstoff resultierte in einem Aktivitätsverlust nach vier Tagen auf 0,54- für HDAC8-1, auf 0,12- für HDAC8-2 bzw. auf 0,29-fach über Basal für HDAC8-3 detektiert werden.

Sowohl Sucrose als auch PMSF hatten keinen signifikanten Einfluss auf die HDAC8-Stabilität der Vereinigungen HDAC8-2 und HDAC8-3. An Tag 13 war hier die Aktivität auf 0,50- bzw. 0,59-fach über Basal gesenkt. Im Gegensatz hierzu führte der Einsatz beider Additive zu einer Stabilisierung des Proteins in HDAC8-1.

Es konnte ausschließlich ein Einfluss der Additiven auf die Proteinstabilität bei hoher Proteinkonzentration nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollte im weiteren Vorgehen die Stabilität der Proteine bei niedriger Konzentration gesteigert werden. Proteine neigen zur Adsorption an Gefäßoberflächen. Insbesondere bei geringen Proteinkonzentrationen wird dieses Phänomen deutlich. Hier können sogenannte Träger- bzw. Füllproteine wie BSA die Oberfläche sättigen und die Lagerbarkeit eines Proteins gewährleisten. Hierzu wurde BSA in den drei Vereinigungen gelöst und die HDAC8-Aktivität ebenfalls periodisch erfasst (siehe Abbildung 18).

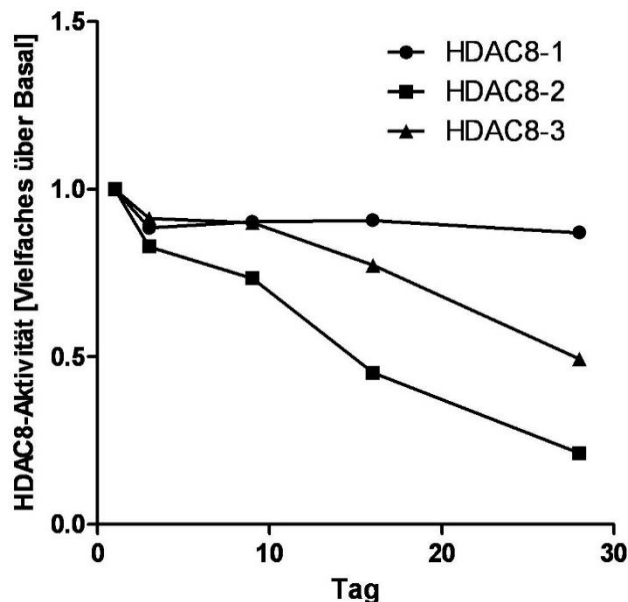


Abbildung 18: Einfluss des Additivs BSA auf die HDAC8-Stabilität.

Den HDAC8-Vereinigungen HDAC8-1 (A: hohe Konzentration, hohe Reinheit), HDAC8-2 (B: niedrige Konzentration, hohe Reinheit) sowie HDAC8-3 (C: niedrige Konzentration, niedrige Reinheit) aus 4.1.1.7 wurde 1% BSA hinzugegeben und die Proben bei 4 °C gelagert. Die HDAC8-Aktivität wurde periodisch unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) gemessen (siehe 3.2.4.1). Die Werte sind Mittelwert (mean) \pm SEM, n=3 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das verwendete Symbol). Die Normierung erfolgte auf die Ausgangsaktivität und diese wurde auf 1 gesetzt.

Die drei Vereinigungen zeigten eine Verminderung der HDAC8-Aktivität für HDAC8-1 gefolgt von HDAC8-3 sowie HDAC8-2. Die Aktivität von HDAC8-1 war nach 27 Tagen auf das 0,86-, von HDAC8-2 auf das 0,21- und von HDAC8-3 auf das 0,49-fache über Basal gesenkt (siehe Abbildung 18).

4.2 HDAC8-Lokalisation in eukaryotischen Zelllinien

4.2.1 Charakterisierung der potentiellen NLS des HDAC8-Proteins

Hu *et al.* (2000) hat im Rahmen seiner Charakterisierung des HDAC-Proteins die Aminosäureabfolge RLRRK (Arg164 bis Lys168) als putative NLS-Sequenz aufgezeigt. Die Lage der NLS ist Abbildung 19 dargestellt.

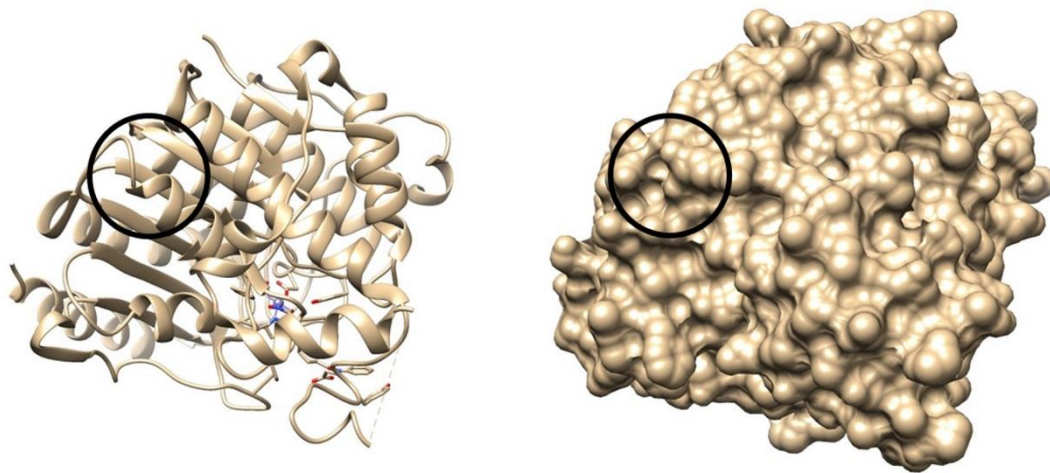


Abbildung 19: Kristallstruktur des HDAC8-Proteins (PDB 1T69) [nach Somoza *et al.*, 2004].

Links: HDAC8-Tertiärstruktur als Cartoon mit SAHA in der Bindetasche. Dargestellt als Stick.

Rechts: Darstellung der Proteinoberfläche.

Die NLS ist in beiden Bildern durch einen schwarzen Kreis hervorgehoben. Die Darstellung erfolgte unter Verwendung der Software Chimera [Pettersen *et al.*, 2004].

Die potentielle NLS des HDAC8-Proteins wurde in Abbildung 19 als frei zugänglich dargestellt. Da es sich jedoch um keine klassische NLS handelte, fanden die beiden Programme NucPred [Brameier, Krings und MacCallum, 2007] sowie PSORT [Nakai und Horton, 1999] Einsatz. Das Programme NucPred verglich die vorgegebene HDAC8-Aminosäuresequenz mit bekannten NLS-Motiven und wies die putative NLS-Sequenz als nicht Lokalisations-bestimmend nach. PSORT zeigte darüber hinaus mit 56,5% eine hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation.

Eine BLAST-Suche nach der putativen NLS ergab 81 Treffer verschiedener Proteine. Hierzu gehörten sowohl cytoplasmatische, mitochondriale wie die NAD⁺-Isocitratdehydrogenase als auch nukleäre wie AREC3.

4.2.2 Quantitative, immunologische Bestimmung des HDAC8-Proteins in den Zelllinien Hek293 sowie K562

Zunächst wurden die beiden Antikörper Sc-11544 von Santa Cruz sowie 17548-1-AP von Proteintech hinsichtlich der Parameter Detektionsgrenze, linearer Bereich sowie Spezifität verglichen werden. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe an rekombinantem HDAC8-Protein in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) separiert und anschließend immunologisch mit den beiden Antikörpern im Western Blot (siehe 3.2.2.4) nachgewiesen (siehe Abbildung 20A).

Zur HDAC8-Quantifizierung in den beiden Zelllinien Hek293 und K562 wurde in drei unabhängigen Experimenten eine Zellyse (siehe 3.2.2.1.1) durchgeführt, 30 µg Totalprotein in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) separiert und die HDAC8-Menge anhand einer Verdünnungsreihe an rekombinantem HDAC8-Protein mit bekannter Konzentration im Western Blot (siehe 3.2.2.4) immunologisch nachgewiesen (siehe Abbildung 20B).

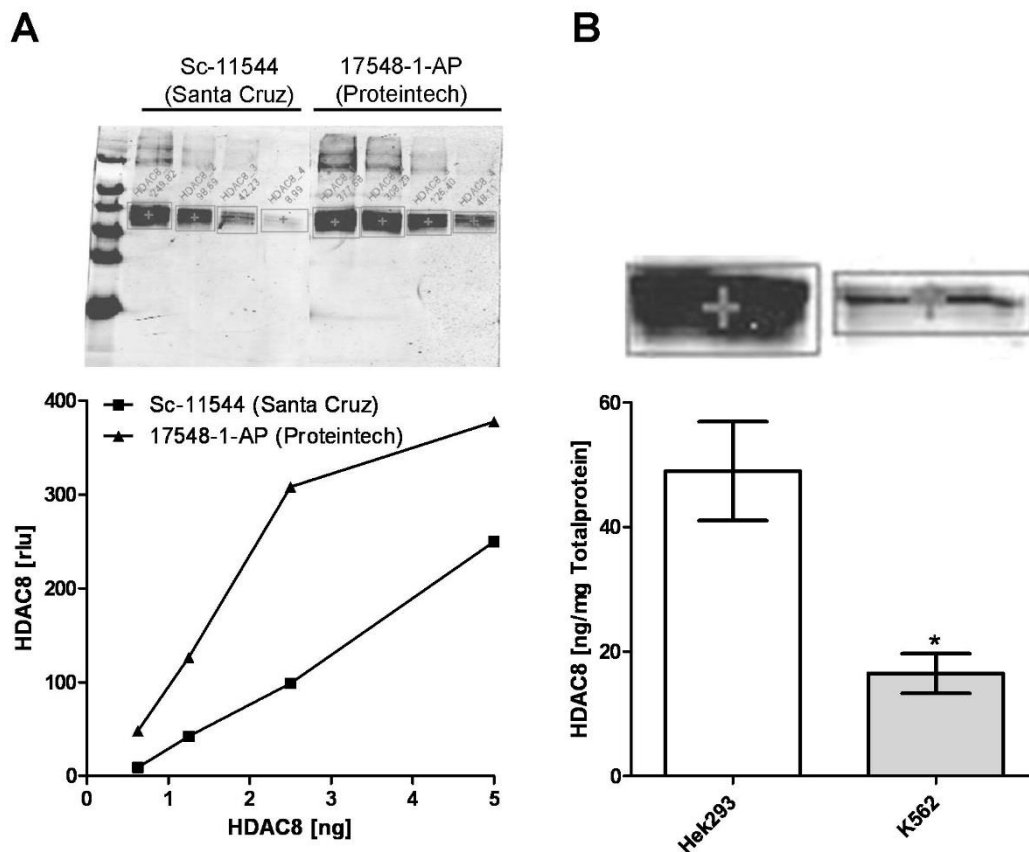


Abbildung 20: Vergleich der beiden Antikörper Sc-11544 (Santa Cruz) sowie 17548-1-AP (Proteintech) zum Nachweis des HDAC8-Proteins (A) und dessen quantitative Detektion in Hek293- sowie K562-Zellen (B).

A Eine Verdünnungsreihe an rekombinantem HDAC8-Protein wurde in einer 12,5%-igen SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) separiert und mit den beiden Antikörpern Sc-11544 (Santa Cruz) sowie 17548-1-AP (Proteintech) im Western Blot (siehe 3.2.2.4) nachgewiesen. B Hek293- sowie K562-Zellen wurden in Zellysepuffer 2 h bei 4 °C aufgeschlossen und die DNA mit Benzonase verdaut (siehe 3.2.2.1.1). Es wurden 30 µg Totalprotein der Zellysate sowie eine Verdünnungsreihe an rekombinantem HDAC8-Protein aufgetragen. Der HDAC8-Nachweis erfolgte nach Separation in einer 12,5%-igen SDS-PAGE immunologisch im Western Blot mit dem Antikörper 17548-1-AP von Proteintech (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.4). Die Werte sind Mittelwert (mean)±SEM, n=3 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol). *:P = <0,05.

Der Vergleich der Antikörper zeigte eine Abhängigkeit der Bandenintensität von der eingesetzten HDAC8-Menge. Beide Antikörper erfassten den gesamten Proteinbereich. Der Einsatz des Antikörpers 17548-1-AP führte zu einem höheren Gesamtsignal, es zeigte sich hier jedoch ab 5 ng HDAC8-Protein eine Sättigung. So lag hier die Bandenintensität nach Einsatz des Antikörpers 17548-1-AP bei 377,68 und nach Sc-11544 bei 249,82 rlu. Dies resultierte bei 17548-1-AP in einer Abflachung der Kurve, sodass hier kein linearer Zusammenhang gegeben war (siehe Abbildung 20A).

Die Quantifizierung ergab einen signifikanten Unterschied der HDAC8-Menge von Hek293 mit 49,0 ng/mL im Vergleich zu K562-Zellen mit 16,5 ng/mL Totalprotein (Abbildung 20B).

4.2.3 Fraktionierte Zelllyse und immunologischer Nachweis des HDAC8-Proteins zur Lokalisationsbestimmung

4.2.3.1 Fraktionierte Zelllyse von Hek293-Zellen und immunologischer Nachweis des HDAC8-Proteins zur Lokalisationsbestimmung

Die fraktionierte Zelllyse von Hek293-Zellen sah zunächst ein Anschwellen der Zellen unter Verwendung eines hypotonischen Puffers vor. Anschließend wurde die Cytoplasmamembran aufgeschlossen, das Cytoplasma abgetrennt und die Kernfraktion mikroskopisch dokumentiert. Es zeigte sich ein starker Einfluss der Detergenzkonzentration. So waren die Kerne nach der Methode von Schreiber *et al.* (1989) nicht mehr intakt (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe des Detergens in den hypotonischen Puffer nach Waltregny *et al.* (2004) führte zunächst zur Stabilisierung der Kernfraktion, jedoch resultierte der nachgeschaltete Waschschritt ebenfalls in der Disruption der Kerne (Daten nicht gezeigt). Die Aufreinigung der Kernfraktion über einen Sucrosegradient nach Leonard und Van der Woude (1975) (siehe 3.2.2.1.2) resultierte im immunologischen HDAC8-Nachweis, alpha-Tubulin als Cytoplasmamarker sowie Acetyl-H3K9 als Kernmarker im Western Blot (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.4; siehe Abbildung 21).

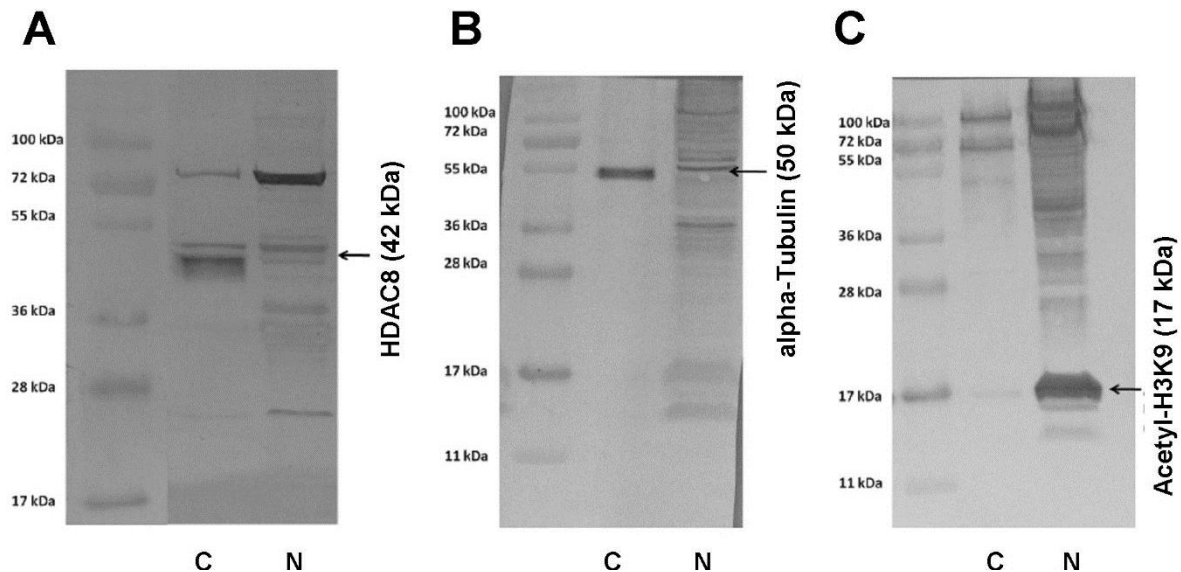


Abbildung 21: HDAC8-Lokalisation nach fraktionierter Zelllyse in Hek293-Zellen.

Zellfraktionierung von ca. $4 \cdot 10^6$ Hek293-Zellen (siehe 3.2.2.1.2). Der Marker Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder sowie 30 µg der cytosolischen und der nukleäre Fraktion wurden in einem 12,5%-igen SDS-Gel separiert (siehe 3.2.2.3.1). Im Western Blot erfolgte der Proteins-Nachweis von HDAC8 (A), alpha-Tubulin (B) sowie Acetyl-H3K9 (C) (siehe 3.2.2.4). Primärantikörper: rabbit anti-HDAC8 (H-145), mouse anti-alpha-tubulin (DM1A), rabbit anti-acetylH3K9. Sekundärantikörper: goat anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase, rabbit polyclonal secondary antibody to mouse IgG – H&L (AP). C: Cytoplasma, N: Nukleus.

Wie in Abbildung 21A dargestellt, war die Intensität der HDAC8-Bande im Cytoplasma höher als im Kern. Neben dieser Bande wurde eine weitere auf Höhe von ca. 72 kDa mit höherer Intensität im Kern detektiert. Im Kern waren darüber hinaus noch weitere Banden oberhalb und unterhalb der HDAC8 vorhanden.

Die Reinheit der Fraktionen wurden mit Hilfe der beiden Marker alpha-Tubulin (ca. 50 kDa; Abbildung 21B) und Acetyl-H3K9 (ca. 17 kDa; Abbildung 21C) gezeigt. Alpha-Tubulin ist ein Protein, das ausschließlich im Cytoplasma vorkommt. Acetyl-H3K9 hingegen ist ein Protein mit nukleärer Lokalisation. Beide Proteine konnten fast ausschließlich in der entsprechenden Fraktion detektiert werden, sodass von einem hohen Reinheitsgrad ausgegangen werden kann.

4.2.3.2 Fraktionierte Zelllyse weiterer Zelllinien und immunologischer HDAC8-Nachweis zur Lokalisationsbestimmung

Die Zellfraktionierung wurde auf K562-Zellen adaptiert (siehe 3.2.2.1.2). Im Anschluss an die Zelllyse wurden 30 µg Totalprotein in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) getrennt und im Western Blot (siehe 3.2.2.4) die Protein HDAC8, alpha-Tubulin sowie Acetyl-H3K9 nachgewiesen (siehe Abbildung 22).

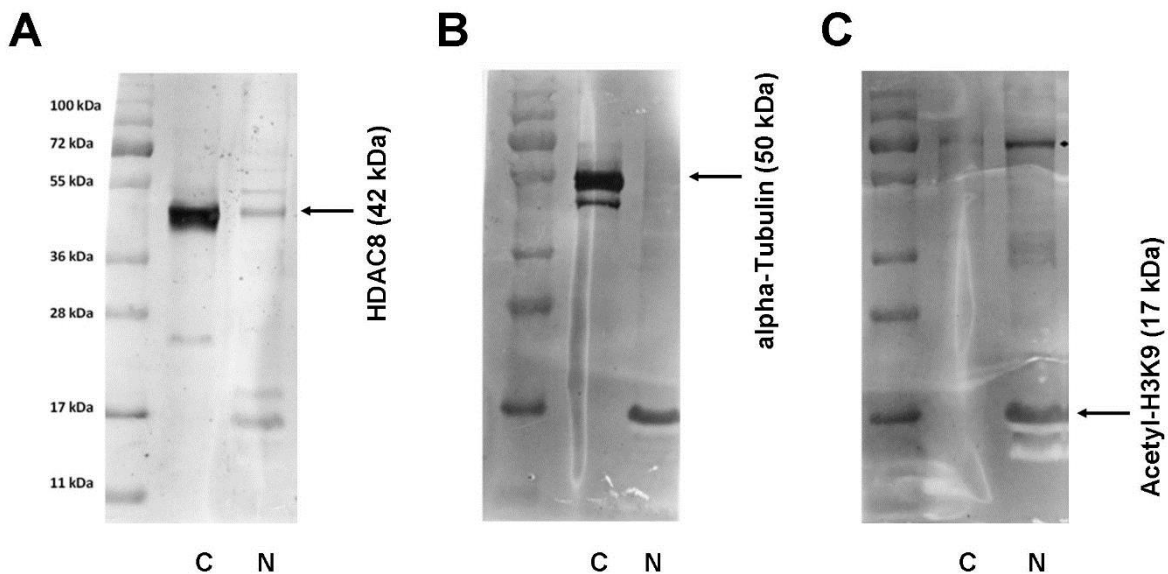


Abbildung 22: Lokalisation von HDAC8 nach fraktionierter Zelllyse in K562-Zellen.

Zellfraktionierung von ca. 4×10^6 K562-Zellen (siehe 3.2.2.1.2). Der Marker Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder sowie 30 µg der cytosolischen und nukleären Fraktion wurden in einem 12,5%-igen SDS-Gel (siehe 3.2.2.3.1) separiert. Im Western Blot (siehe 3.2.2.4) erfolgte der Nachweis von HDAC8 (A), alpha-Tubulin (B) sowie Acetyl-H3K9 (C) (siehe 3.2.2.4). Primärantikörper: rabbit anti-HDAC8 (H-145), mouse anti-alpha-tubulin (DM1A), rabbit anti-acetylH3K9. Sekundärantikörper: goat anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase, rabbit polyclonal secondary antibody to mouse IgG – H&L (AP). C: Cytoplasma, N: Nukleus.

Der immunologische Nachweis von HDAC8 in Abbildung 22 führte zu einer intensiveren HDAC8-Bande im Cytoplasma als im Kern. In beiden Kompartimenten wurden sowohl oberhalb als auch unterhalb von HDCA8 weitere Banden erfasst, die sich jedoch nicht entsprachen.

Die beiden Marker zur Bewertung der Fraktionsreinheit wiesen bei Einsatz des anti-alpha-Tubulin-Antikörpers eine Bande in Höhe von ca. 50 kDa ausschließlich in der cytoplasmatischen Fraktion nach (siehe Abbildung 22B). Das Protein Acetyl-H3K9 bei ca. 17 kDa konnte damit einhergehend nur im Nukleus detektiert werden (siehe Abbildung 22C).

Als weitere Zelllinien wurden Cos7, HaCaT, OLN-93, SH-SY5Y sowie HeLa eingesetzt (siehe Abbildung 23).



Abbildung 23: Fraktionierte Zelllyse zum Nachweis der HDAC8-Lokalisation in den Zelllinien Cos7, HaCaT, OLN-3, HeLa sowie Sh-SY5Y.

Zellfraktionierung der Zellen Cos7, HaCaT, OLN-93, HeLa sowie Sh-SY5Y (siehe 3.2.2.1.2). Der Marker Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder sowie die cytosolische und nukleäre Fraktion wurden in einem 12,5%-igen SDS-Gel (siehe 3.2.2.3.1) separiert. Im Western Blot (siehe 3.2.2.4) erfolgte der HDAC8-Nachweis (siehe 3.2.2.4). Primärantikörper: rabbit anti-HDAC8 (17548-1-AP). C: Cytoplasma, N: Nukleus.

Die untersuchten Zelllinien wiesen eine unterschiedliche HDAC8-Expression auf (siehe Abbildung 23). Für die Zelllinien Cos7 erfolgte kein HDAC8-Nachweis. Das HDAC8-Protein wurde in HeLa-Zellen schwach im Cytoplasma und nicht im Kern detektiert. In HaCaT-, SH-SY5Y- sowie OLN-93-Zellen wurde das HDAC8-Protein in beiden Kompartimenten nachgewiesen.

4.2.4 Überexpression der HDAC8 als Fusionsprotein mit GFP in Hek293-Zellen

Es wurde ein Fusionsprotein aus HDAC8 und GFP im Vektor pEGFPN2 HDAC8-EGFP erzeugt, sequenziert und durch Transfektion in Hek293-Zellen eingebracht (siehe 3.2.7). GFP wurde an einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) erfasst (siehe Abbildung 24A und B). Darüber hinaus sollte nach viertägiger Selektion mit G418 das Fusionsprotein im Western Blot nachgewiesen werden. Es wurden je 30 µg Totalprotein aus Hek293 Wt- sowie Hek293 HDAC8-GFP-Zellen in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) separiert und immunologisch HDAC8 im Western Blot (siehe 3.2.2.4) nachgewiesen (siehe Abbildung 24C).

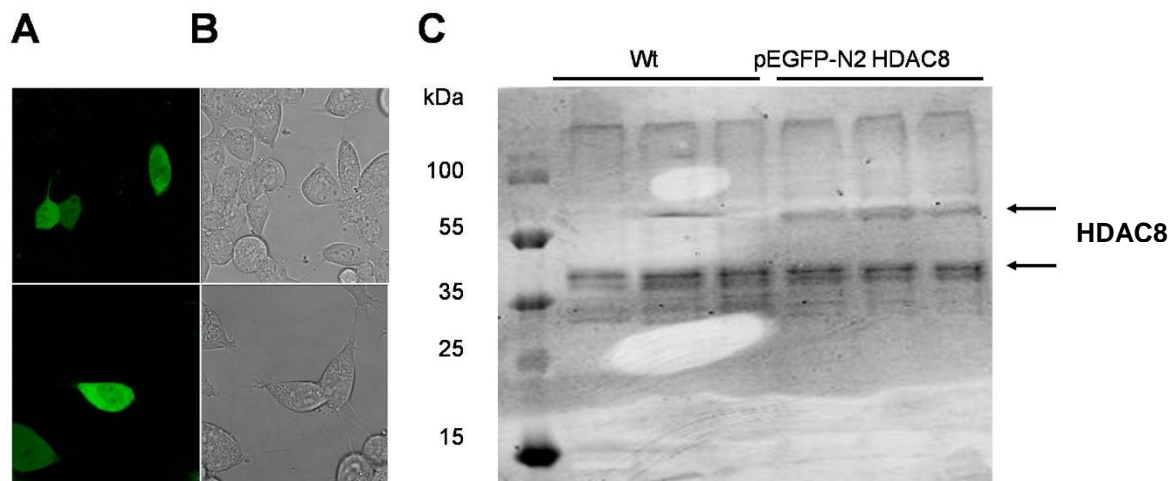


Abbildung 24: HDAC8-Lokalisation in Hek293-Zellen nach Überexpression unter Verwendung des Vektors pEGFPN2 HDAC8-EGFP.

Die Vektor-DNA pEGFPN2 HDAC8-EGFP wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des Transfektionsreagenzes JetPei in Hek293 Zellen transfiziert (siehe 3.2.1.5). Die Inkubationszeit betrug 2 h. Die Bildgebung erfolgte nach 16 h Inkubationszeit am CLSM Leica TCS SP (Leica Microsystems) durch Anregung von GFP bei 488 nm mittels ArKr-Laser über einen RSP500 dichroitischen Filter. Die Fluoreszenzemission wurde zwischen 500 und 600 nm erfasst (A). Darüber hinaus wurden die Zellen im Durchlichtmodus abgebildet (B). Dargestellt sind zwei verschiedene Bildausschnitte (siehe 3.2.1.7.1). (C) Im Anschluss an eine Transfektion von 4 µg DNA unter Verwendung von 8 µL Turbofekt-Transfektionsreagenz wurde eine 96-stündige Selektion mit 450 µg/mL G418 durchgeführt. Der immunologische Nachweis der HDAC8-Überexpression (17548-1-AP, Proteintech) im Western Blot (siehe 3.2.2.4) erfolgte mit 30 µg Totalprotein aus Hek293 Wt- sowie Hek293 HDAC8-GFP-Zelllysats (siehe 3.2.2.1.1) nach Separation in einer 12,5%-igen SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) (C).

Wie in Abbildung 24 dargestellt konnte GFP in der gesamten Zelle nachgewiesen werden. Da das GFP-Protein C-terminal an HDAC8 ergänzt wurde, sollte der Nachweis ebenfalls eine

vollständige HDAC8-Proteinexpression sicherstellen (siehe Abbildung 24A und B). Die Überexpression von HDAC8 wurde im Western Blot gezeigt. So wurde oberhalb der HDAC8-Bande zwischen 50 und 100 kDa nach der Transfektion mit pEGFPN2 HDAC8-EGFP eine weitere schwache Bande nachgewiesen (siehe Abbildung 24C).

4.2.5 Immunfluoreszenz-basierter Nachweis der Lokalisation von HDAC8 in Hek293-Zellen
Der HDAC8-Lokalisationsstatus wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.2.1.6) erfasst (siehe Abbildung 25).

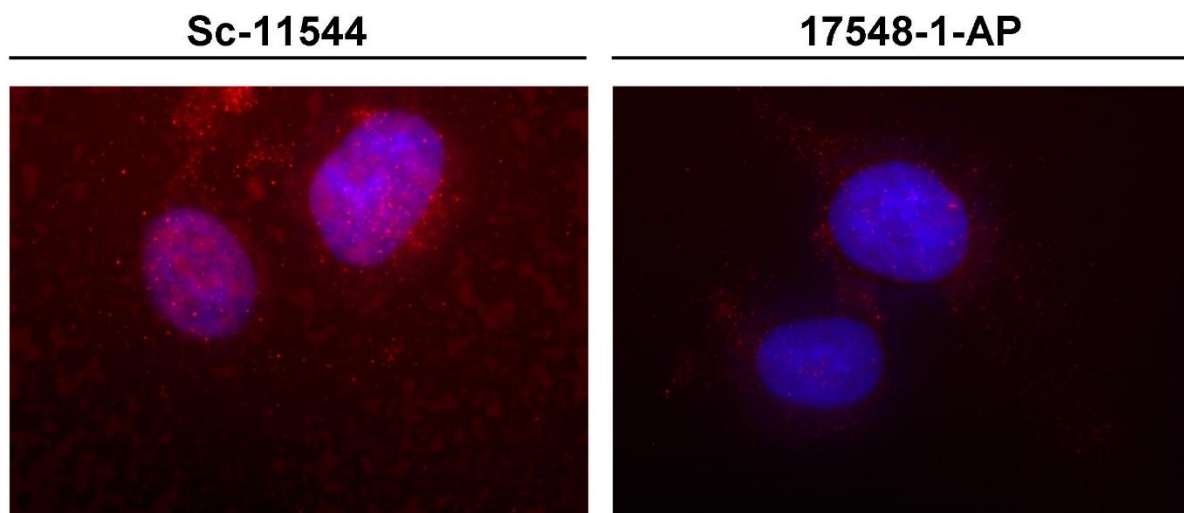


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung des HDAC8-Proteins in Hek293-Zellen mit den Antikörpern Sc-11544 (Santa Cruz) und 17548-1-AP (Proteintech).

Hek293-Zellen wurden ausgesät und nach 48 h eine Immunfluoreszenzfärbung mit den anti-HDAC8-Antikörpern Sc-11544 (Santa Cruz, 1:50) sowie 17548-1-AP (Proteintech, 1:50) durchgeführt (siehe 3.2.1.6). Der Nachweis erfolgte mit den beiden Sekundäntikörpern Alexa fluor 594 Hühnchen anti-Ziege bzw. Alexa fluor 488 Ziege anti-Kaninchen bei der entsprechenden Wellenlänge (rot). Darüber hinaus wurden die Kerne mit DAPI (0,4 µg/mL) gefärbt (blau).

In Abbildung 25 ist der Vergleich der beiden anti-HDAC8-Antikörper sowie der Kernnachweis dargestellt. Die DAPI-Färbung resultierte in einer klaren Abgrenzung des Kerns vom Cytoplasma. Der Nachweis der beiden Antikörper führte hingegen zu einem divergenten Bild. Der Antikörper Sc-11544 von Santa Cruz assoziierte auch unspezifisch an andere Bereiche außerhalb der Zelle (siehe Abbildung 25 links). Die Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung des Antikörpers 17544-1-AP wies eine Lokalisation in der gesamten Zelle nach.

4.2.5.1 Überexpression und Lokalisationsbestimmung der HDAC8 als Fusionsprotein mit dem schaltbaren Fluoreszenzprotein mEos2 in Hek293-Zellen

Aus dem Vektor pEGFPN2 HDAC8-EGFP wurde das Gen codierend für GFP herausgeschnitten (siehe 3.2.7.4). Das mEos2-Gen wurde unter Verwendung des Vektor pUBmEos2 mittels PCR amplifiziert (siehe 3.2.7.1, 3.2.7.5 und 3.2.7.6) und über die beiden

Schnittstellen für EcoR1 und NOT1 in den Vektor pEGFPN2 HDAC8-EGFP ligiert und so der Vektor pEGFP-N2 HDAC8-mEOS2 erzeugt (siehe 3.2.7.7). Die Sequenzierungsergebnisse (siehe 3.2.7.13) wiesen eine Deletion von 21 Basenpaaren im N-terminalen Bereich des mEos-Gens nach. Aus diesem Grund wurden diese mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe 3.2.7.2) eingefügt und die korrekte Sequenz ebenfalls durch eine Sequenzierung nach Sanger (siehe 3.2.7.13) bestätigt. Der Vektor wurde mittels Transfektion in Hek293-Zellen eingebracht (siehe 3.2.1.5).

4.2.5.1.1 Emissionsspektrum des schaltbaren Fluoreszenzprotein mEos2 in Hek293-Zellen

Um beide Spezies des Fluoreszenzproteins unterscheiden zu können ist es essentiell diese getrennt erfassen zu können. Hierzu wurde zunächst ein Emissionsspektrum vor und nach der Schaltung durchgeführt (siehe Abbildung 26).

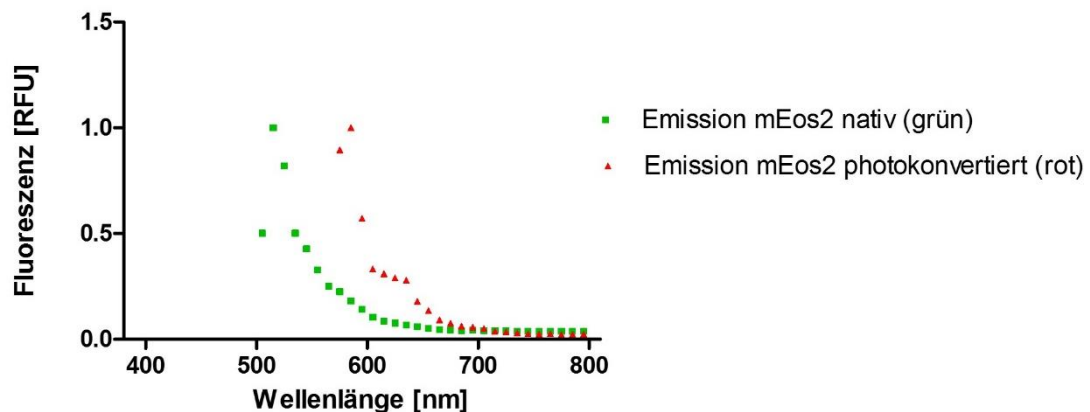


Abbildung 26: Emissionsspektrum des photoschaltbaren Fluoreszenzproteins mEos2.

1 µg der Vektor-DNA pEGFP-N2 HDAC8-mEOS2 wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Gene Juice in Hek293-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde eine grün fluoreszierende Zelle (Anregung 488 nm (Argonlaser), Detektion (505-550 nm)) durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 405 nm (405 Diodenlaser) in einem Bleichpunkt (Bleachpoint) konvertiert. Das Emissionsspektrum in beiden Kanälen wurde erfasst (siehe 3.2.1.7.2).

Wie in Abbildung 26 gezeigt, sind die Emissionsspektren vor und nach der Konvertierung nicht über den gesamten Bereich voneinander getrennt. Die Grenzen der Emissionsdetektion wurden daher für nachfolgende Experimente so gewählt, dass die Detektion des grünen im roten Kanal minimal, die Höhe des Signals im roten Bereich jedoch ausreichend war (grün: 505-550, rot: 600-700). Bei einer Wellenlänge von 645 nm wurde im grünen Kanal eine Intensität von 0,06 rfu und im roten Kanal von 0,18 rfu erfasst.

4.2.6 Lokalisationsbestimmung der HDAC8 als Fusionsprotein mit dem schaltbaren Fluoreszenzprotein mEos2 in Hek293-Zellen

Die Anregung bei 488 nm wies die HDAC8-Expression nach (siehe 3.2.1.7.2). Diese wurden mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Bleichpunkt (Bleachpoint) für 500 ms konvertiert. Unmittelbar nach der Konvertierung erfolgte die Anregung bei 488 sowie 561 nm. Die Fluoreszenzemission wurde sowohl bei 505 bis 550 als auch 650 bis 750 nm detektiert (siehe Abbildung 27).

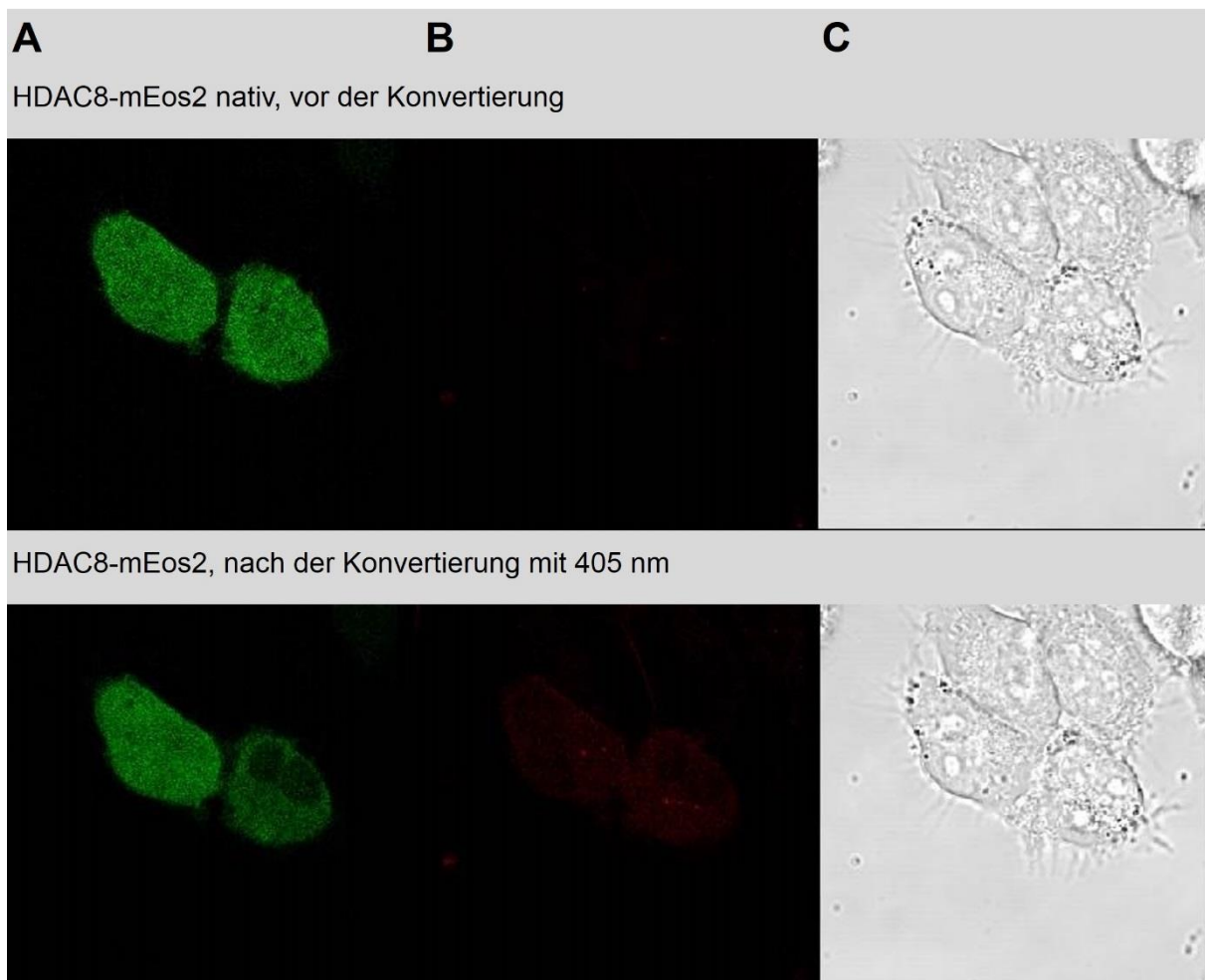


Abbildung 27: Lokalisationsbestimmung des HDAC8-Proteins und Photokonvertierung des Fusionsproteins mEos2.

1 μ g der Vektor-DNA pEGFP-N2 HDAC8-mEOS2 wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Gene Juice in Hek293-Zellen transfiziert. Die Photokonvertierung bei 405 nm (Diodenlaser) wurde in einem Bleichpunkt (Bleachpoint) im Kern (obere Zelle) sowie im Cytoplasma (untere Zelle) am CLSM Leica TCS SP (Leica Microsystems) dokumentiert (siehe 3.2.1.7.2). A: Anregung des nativen HDAC8-mEos2-Proteins (Ex 488 nm (Argonlaser), Em 505-550 nm). B: Anregung des photokonvertierten HDAC8-mEos2-Proteins (Ex 561 nm (Argonlaser), Em 650-750 nm). C: Durchlicht

Die Detektion des Fluoreszenzproteins HDAC8-mEos2 wurde in der gesamten Zelle erfasst (siehe Abbildung 27). Die Photokonvertierung resultierte in einer Zunahme der Fluoreszenz

bei einer Welllänge im roten Bereich (Ex 561 nm, Em 650-750 nm). Davon abweichend wurde in wenigen Zellen eine Lokalisation beschränkt auf bestimmte Zellkompartimente gezeigt (siehe Abbildung 28).

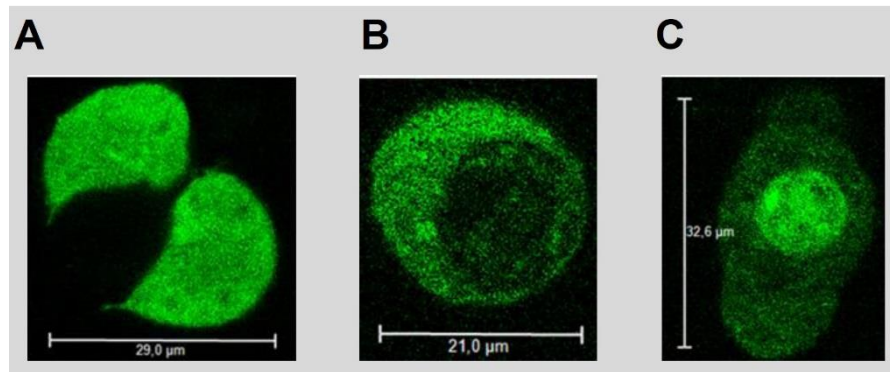


Abbildung 28: HDAC8-Lokalisation in Hek293-Zellen

1 µg der Vektor-DNA pEGFP-N2 HDAC8-mEOS2 wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Gene Juice in Hek293-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden drei grün fluoreszierenden Zellen (Anregung 488 nm (Argonlaser), Detektion (505-550 nm)) aufgenommen. Die Untersuchungen wurden am CLSM Leica TCS SP (Leica Microsystems) durchgeführt (siehe 3.2.1.7.2).

In Abbildung 28 ist die HDAC8-Lokalisation dargestellt, wobei in A HDAC8-mEos2 in der gesamten Zelle, in B hauptsächlich cytoplasmatisch und in C hauptsächlich nukleär lokalisiert war.

Der Bleicheffekt bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurde in vier unabhängigen Messungen in insgesamt sieben Zellen über einen Zeitverlauf von 147 sec zwischen 505 und 550 nm gemessen. Die Differenz zwischen dem End- und dem Anfangswert bezogen auf den Mittelwert der Intensität über die gesamte Messdauer betrug $3,60 \pm 2,9$ und wies folglich die Stabilität des Fluorophors nach.

4.2.6.1.1 Erfassung des Transportvorganges des HDAC8-Proteins zwischen den Zellkompartimenten Nukleus und Cytoplasma

Der Transportprozess von acht unabhängigen Messungen wurde für mEos2 sowie HDAC8-mEos2 dokumentiert. Der Fluorophor mEos2 wurde mit UV-Licht irreversibel photo-konvertiert, was in einer geänderten Anregungs- sowie Emissionswellenlänge resultierte. In Abbildung 29A ist die Fluoreszenzintensität vor, nach und während des Schaltprozesses dargestellt. Des Weiteren ist in der Mittelwert der Intensitätszunahme während der Konvertierung als Steigung gezeigt (Abbildung 29B).

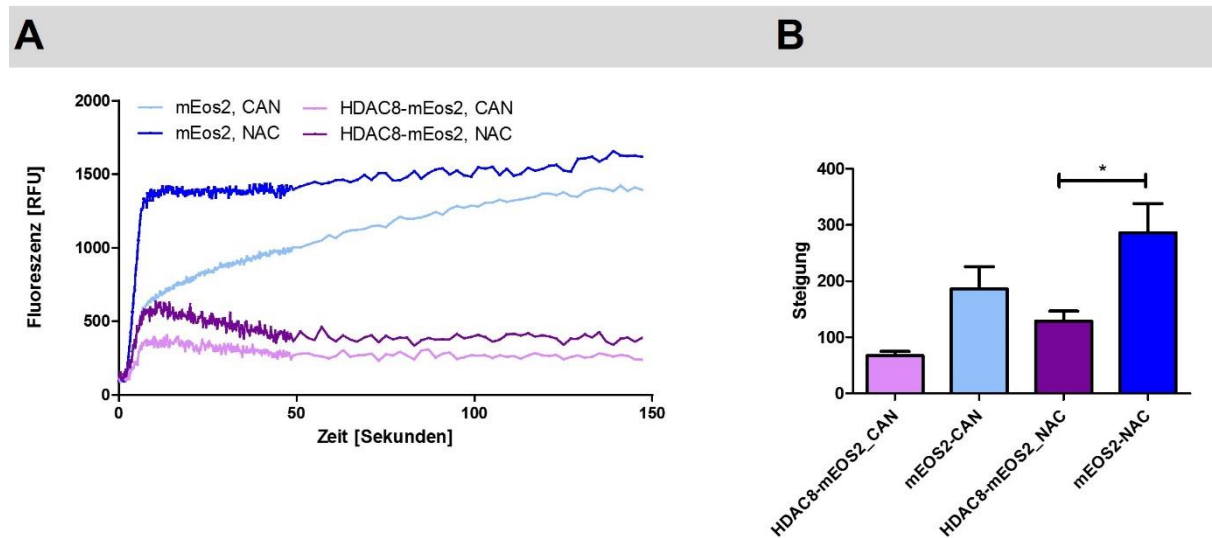


Abbildung 29: Photokonvertierung des Fluorophors mEos2 sowie als Fusionsprotein mit HDAC8.

1 µg der Vektor-DNA pEGFP-N2 HDAC8-mEOS2 sowie pUB-mEos2 wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes JetPEI in Hek293-Zellen transfiziert. A: Die Photokonvertierung bei 405 nm (Diodenlaser) wurde in einem Bleichbereich (ROI) im Kern oder im Cytoplasma am CLSM Leica TCS SP (Leica Microsystems) bei den Wellenlängen Ex 561 nm, Em 600-700 nm dokumentiert. B: Steigung der Fluoreszenz während des Schaltprozesses. CAN: Konvertierung im Cytoplasma, Transport in den Kern, ROI im Kern. NAC: Konvertierung im Kern, Transport ins Cytoplasma, ROI im Cytoplasma. Die Werte sind Mittelwerte (mean)±SEM, n=8 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol). *:P = <0,05.

Zeitgleich mit der Konvertierung des mEos2-Proteins wurde eine Zunahme des konvertierten Fluorophors in beiden Kompartimenten festgestellt. Dies spricht für eine schnelle Konvertierungsrate sowie einen unmittelbaren Transport. Aus diesem Grund wurde die Steigung während des Schaltvorgangs als Mittelwert vergleichend betrachtet, woraus sich ein tendenzieller Unterschied zwischen mEos2 ($186,20 \pm 39,6$ rfu) und HDAC8-mEos2 ($67,31 \pm 7,6$ rfu) für den Transport aus dem Cytoplasma in den Kern ergab. Für den Transport aus dem Kern in das Cytoplasma wurde mit $286,20 \pm 52,07$ rfu für mEos2 und $128,90 \pm 17,50$ rfu für HDAC8-mEos2 ein signifikanter Unterschied gemessen. In beiden Fällen war der Transport des Fusionsproteins tendenziell verlangsamt.

4.3 Die Identifikation von HDAC8-Interaktionen

Die proklamierte Funktion der HDAC-Familie ist die Deacetylierung N-terminaler Lysine von Histonen. Diverse Untersuchungen hatten jedoch gezeigt, dass eine Vielzahl an HDAC-Isoformen weitere Aufgaben besitzen. Bekannte HDAC8-Interaktionen wiesen eine deutliche Gewebespezifität auf und beschränkten sich fast ausschließlich auf die reine Bindung. Des Weiteren hinaus konnten in HSMM, SMMHC und in Jurkat-Zellen eine cytoplasmatische Lokalisation von HDAC8 in Hek293-Zellen gezeigt werden [Waltregny *et al.*, 2004; Balasubramanian *et al.*, 2008].

4.3.1 Identifikation von HDAC8-Proteinbindungspartnern

4.3.1.1 Blau-native Gelelektrophorese und anschließende immunologische Detektion des HDAC8-Proteins und -Bindepertnern

Hek293-Zellen wurden lysiert (siehe 3.2.2.1.1), die Proteine in einer 12,5%-igen Gelelektrophorese getrennt und anschließend im Western Blot HDAC8 nachgewiesen. Ein Nachweis des HDAC8-Proteins (rekombinant hergestellt bzw. aus Hek293-Zelllysats) war mit den beiden Antikörpern Sc-11544 (Santa Cruz) und 17548-1-AP (Proteintech) nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Auch die Entfärbung der Membran mit Essigsäure sowie Magermilch resultierte in keinem Nachweis. Des Weiteren sollte in Anlehnung an das klassische Laemmli-System der Einfluss des Coomassie-Farbstoffs auf die Antikörper-Affinität untersucht werden. Hierzu wurde ein System mit geringer Coomassiekonzentration eingesetzt (siehe Abbildung 30).

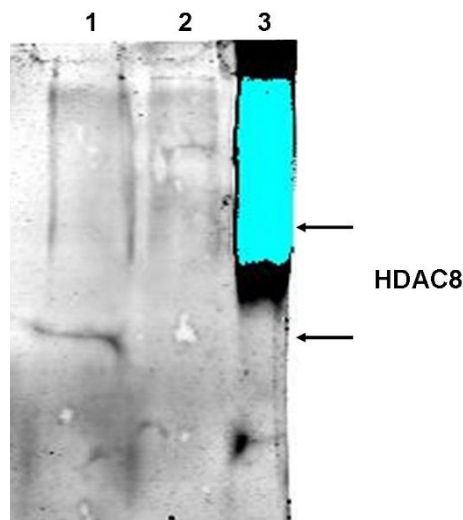


Abbildung 30: Blau-native Gelelektrophorese nach Laemmli zur Identifikation von HDAC8-Proteinbindepertnern.

Hek293-Zelllysats (siehe 3.2.2.1.1) in den beiden Konzentrationen 24,4 (1) und 12,2 µg (2) sowie 265 ng rekombinantes HDAC8-Protein (3) (siehe 3.2.6.2) wurden in einer 12,5%-igen Gelelektrophorese separiert (siehe 3.2.2.3.4) und im Western Blot unter Verwendung des anti-HDAC8-Antikörpers 17548-1-AP (Proteintech) sowie des Sekundärantikörpers Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight800 nachgewiesen (siehe 3.2.2.4).

Das rekombinante HDAC8-Protein wurde in einer deutlich zu hohen Konzentration eingesetzt. Die Proteinmenge konnte nicht separiert werden, sodass die Bande nicht als Referenz verwendet werden konnte. Darüber hinaus lag die Intensität am Detektionslimit, sodass die Bande bläulich (Detektionslimit erreicht) erschien (siehe Abbildung 30). Eine Konzentration von 24,4 µg Hek293-Zelllysats führte zum Nachweis einer Bande mit schwacher Intensität. Oberhalb dieser Bande erfolgte kein weiterer Proteinnachweis.

4.3.1.2 Quervernetzung von HDAC8-Proteinkomplexen *in vitro*

In der nativen Gelelektrophorese war es nicht möglich eine Proteininteraktion zu zeigen. Ursache hierfür könnte eine schwache Bindung zwischen dem HDAC8-Protein und potentiellen Interaktionspartnern sein. Aus diesem Grund wurde zur Stabilisierung der Bindung Formaldehyd und DSS als Vernetzungsmittel eingesetzt. Dies ermöglicht darüber hinaus den Einsatz der klassischen SDS-PAGE mit erhöhter Trennleistung.

4.3.1.2.1 Formaldehyd-basierte Quervernetzen von HDAC8-Proteinkomplexen und immunologischer HDAC8-Nachweis

Das Vernetzungsmolekül Formaldehyd verbindet primäre Aminofunktionen von Proteinen mit einem Abstand von 2,3 bis 2,7 Å (Klockenbusch und Kast, 2010). Dies führt zur Stabilisierung von Proteinkomplexen und sollte hier dem Nachweis von HDAC8-Bindepartnern dienen (siehe 3.2.2.7.1). Folgende Parameter wurden variiert: Formaldehydkonzentration, Inkubationszeit sowie –temperatur (siehe Abbildung 31). Grundlage hierfür waren Untersuchungen von Klockenbusch und Kast (2010).

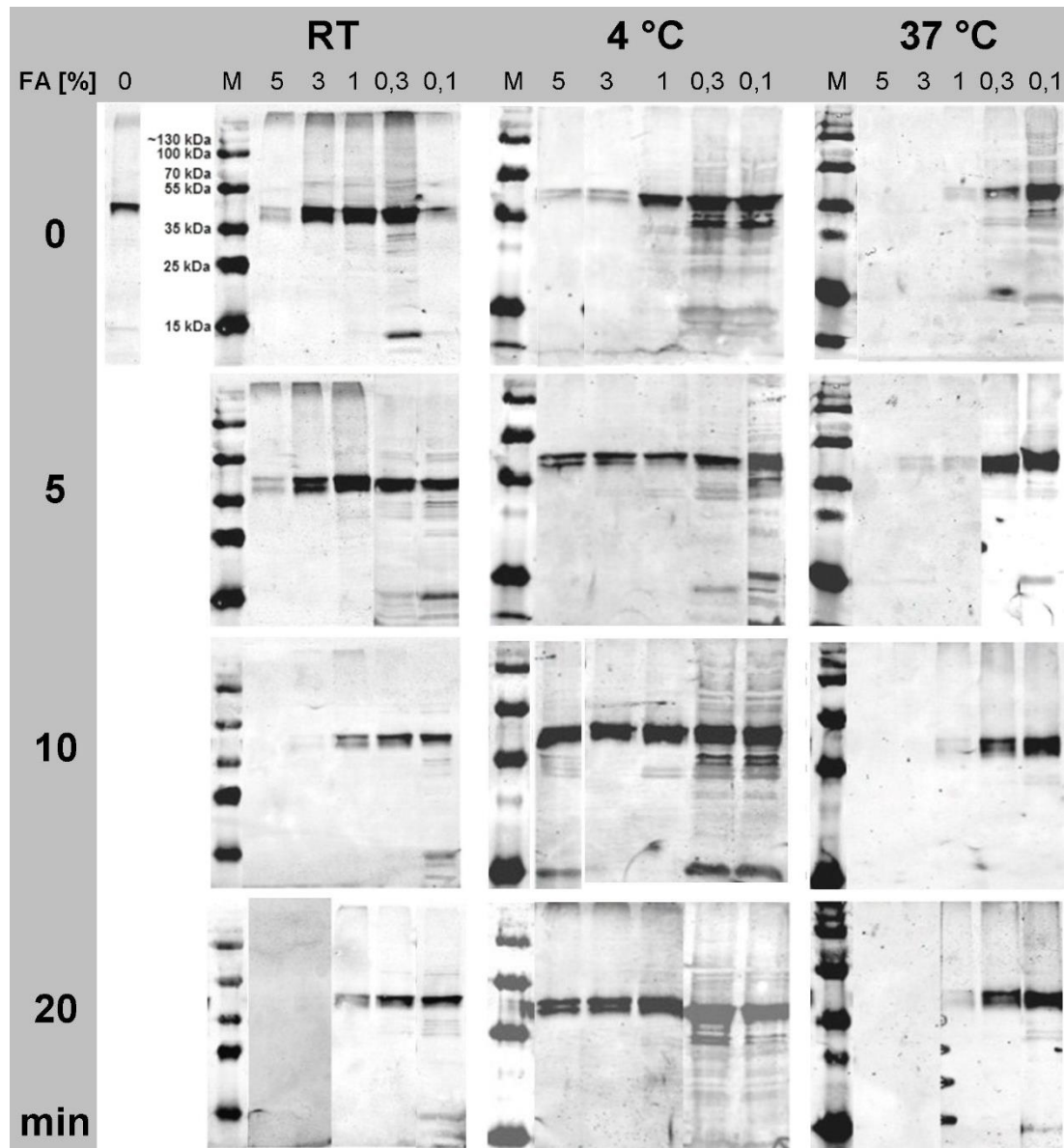


Abbildung 31: Formaldehyd-induzierte Quervernetzung von Proteinen in Hek293-Zellen zum Nachweis von HDAC8-Interaktionspartnern.

Hek293-Zellen wurden mit den Konzentrationen 5, 3, 1, 0,3 sowie 0,1% Formaldehyd in PBS bei pH 7,4 für 0, 5, 10 bzw. 20 min bei 4 °C, RT sowie 37 °C inkubiert (siehe 3.2.2.7.1). Die Reaktion wurde mit 125 mM Glycin beendet. Anschließend wurde eine Zellyse (siehe 3.2.2.1.1) durchgeführt und 15 µL der Lösung in einer 12,5%-igen SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) separiert und mit dem anti-HDAC8-Antikörper (17548-1-AP, Proteintech) sowie dem Sekundärantikörper anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 nachgewiesen (siehe 3.2.2.4).

Die Kontrollprobe wies ausschließlich eine Bande auf Höhe des HDAC8-Proteins nach. Hohe Formaldehydkonzentrationen sowie lange Inkubationszeiten resultierten in einer verringerten Proteinkonzentration, was einhergehend mit der geringeren Pelettgröße auf eine partielle Zellyse hindeutete. Die Konzentration 0,1% sowie 0,3% zeigten bei den Temperaturen RT und 4 °C weitere Banden oberhalb und unterhalb des HDAC8-Proteins auf, wobei diese bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C eine höhere Intensität aufwiesen. Auch die

Inkubationszeit nahm Einfluss auf die Anzahl der Banden. Insbesondere eine Dauer von 5 sowie 10 min wies eine hohe Anzahl weiterer Banden auf.

4.3.1.2.2 Vergleich von Formaldehyd und para-Formaldehyd zum Quervernetzen von HDAC8-Proteininteraktionen

Im Folgenden wurden die beiden Quervernetzer Formaldehyd sowie para-Formaldehyd bei den beiden Konzentrationen 0,1% und 0,3% verglichen werden (siehe 3.2.2.7.1). Des Weiteren sollte zum Ausschluss von Artefakten die Reversibilität durch die Erhöhung der Denaturierungstemperatur von 65 °C auf 95 °C gezeigt werden (siehe Abbildung 32).

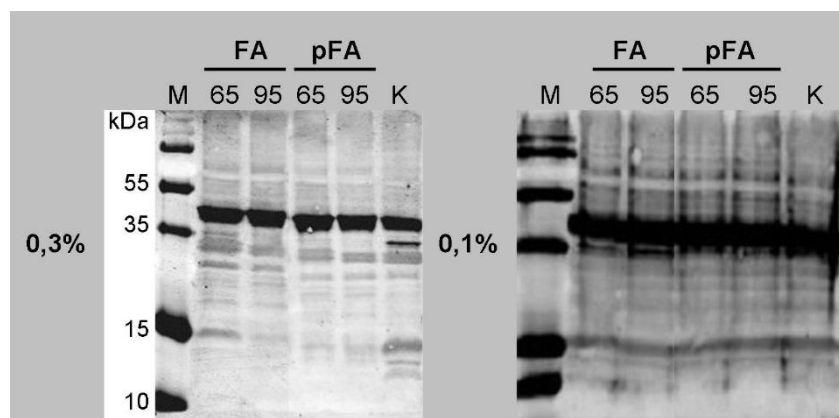


Abbildung 32: Vergleich von Formaldehyd und para-Formaldehyd zum Quervernetzen des HDAC8-Proteins und Interaktionspartnern.

Hek293-Zellen wurden mit den Konzentrationen 0,3 sowie 0,1% Formaldehyd bzw. para-Formaldehyd in PBS bei pH 7,4 5 min bei RT inkubiert (siehe 3.2.2.7.1). Das Abstoppen wurde mit 125 mM Glycin durchgeführt und anschließend die Zellen aufgeschlossen (siehe 3.2.2.1.1). Die Denaturierung erfolgte bei 65 sowie 95 °C. 15 µL der Lösung wurde in einer 12,5%-igen SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) separiert und mit den Antikörpern 17548-1-AP (Proteintech) sowie anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (Licor) nachgewiesen (siehe 3.2.2.4).

Beide Formaldehydkonzentrationen führten zum Nachweis der HDAC8-Bande und weiteren Banden oberhalb und unterhalb von 45 kDa (siehe Abbildung 32). Bei Einsatz von 0,3% Formaldehyd waren diese marginal intensiver. Der Vergleich von Formaldehyd und para-Formaldehyd zeigte keinen Unterschied. Ebenfalls führte die Erhöhung der Denaturierungstemperatur von 65 auf 95 °C nicht zu einer Reduktion der zusätzlichen Banden. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um Artefakte handelt.

4.3.1.2.3 DSS-induzierte Quervernetzung von HDAC8-Proteinkomplexen und immunologischer Nachweis

Im Folgenden wurde DSS alleinständig sowie in Kombination mit Formaldehyd zur Quervernetzung von HDAC8-Proteininteraktionen eingesetzt (siehe 3.2.2.7.2; siehe Abbildung 33).

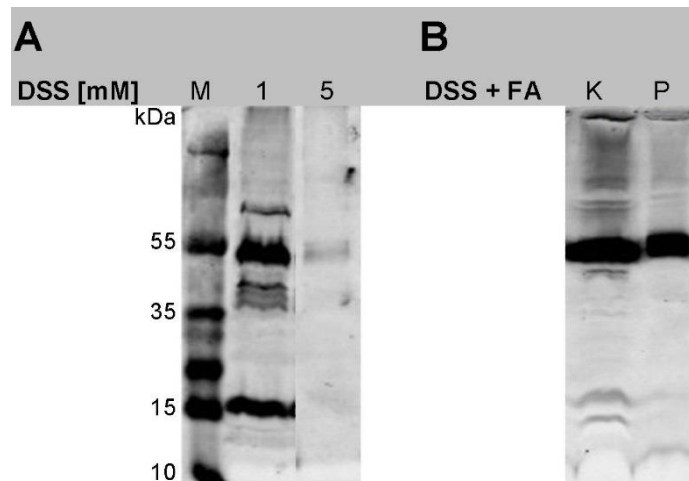


Abbildung 33: Einsatz von DSS zum Quervernetzen von HDAC8-Interaktionen.

Hek293-Zellen wurden mit den Konzentrationen 1 sowie 5 mM DSS für 5 min bei RT inkubiert (A). Die Inkubation von DSS und Formaldehyd in Kombination erfolgte direkt in der Zellkulturflasche (B). Zunächst wurden die Zellen mit 0,1% DSS für 25 min bei RT und anschließend mit 1% Formaldehyd für 10 min ebenfalls bei RT inkubiert (siehe 3.2.2.7.3). Die Reaktion wurde mit 50 mM Glycin für 10 min beendet. 15 µL der Lösung wurde in einer 12,5%-igen SDS-PAGE separiert und im Western Blot mit dem anti-HDAC8-Antikörpers (17548-1-AP, Proteintech) sowie dem Sekundärantikörper anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (Licor) nachgewiesen (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.4). K: Kontrolle, P: Probe, FA: Formaldehyd

Das HDAC8-Protein wurde in allen Proben nachgewiesen, jedoch führte eine Konzentration von 5 mM DSS zu einer geringeren Bandenintensität (siehe Abbildung 33). Bei 1 mM DSS wurden oberhalb und unterhalb von HDAC8 weitere Banden erfasst. Der duale Quervernetzungsschritt wies keine weiteren Banden nach.

4.3.1.2.4 Die Kombination von DSS und Formaldehyd zur Quervernetzung von HDAC8-Proteininteraktionen und anschließende Präzipitation mittels Antikörper sowie spezifischem HDAC8-Inhibitor

Zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung der HDAC8-Proteinkomplexe kam im Anschluss an den Quervernetzungsschritt eine Präzipitation zum Einsatz. Zunächst wurde geklärt, ob die Substanz MB669 einen vergleichbaren IC50-Wert zur Ausgangssubstanz PCI-34051 aufwies sowie gekoppelt an Sepharose-Partikel zur HDAC8-Präzipitation eingesetzt werden kann (siehe Abbildung 34).

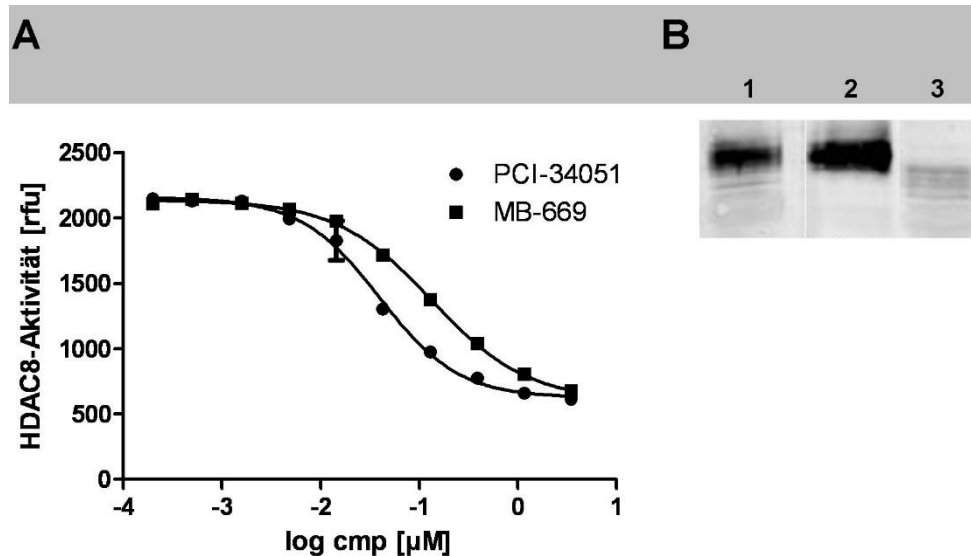


Abbildung 34: Inhibitorischer Effekt der Substanzen PCI-34051 und MB-669 gegen das HDAC8-Protein und Präzipitation des HDAC8-Proteins unter Verwendung der Sepharose/MB-669.

(A) HDAC8 wurde rekombinant in *E.coli* XL-1-Zellen (transformiert mit pQE70-HDAC8) exprimiert (siehe 3.2.6.2) und über die IMAC-Methode aufgereinigt. Das Protein wurden mit den beiden Substanzen 15 min bei RT im Aktivitätstest (siehe 3.2.4.2) inkubiert und die Aktivität mit Hilfe des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC bei einer Konzentration von 30 μ M erfasst ($\lambda_{EM} = 340$ nm/ $\lambda_{EX} = 460$ nm). Die Werte sind Mittelwerte (mean) \pm SEM, n=3 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das verwendete Symbol).

(B) Hek293-Zellen wurden lysiert (siehe 3.2.2.1.1) und mit Sepharose/MB-669 μ N bei 4 °C inkubiert (siehe 3.2.2.5.2). Die Elution erfolgte in Auftragspuffer für 15 min bei 95 °C und 450 rpm. 15 μ L des Zelllysates (1), des Eluats (2) sowie des Überstandes (3) wurde in einer 12,5%-igen SDS-PAGE separiert und im Western Blot mit dem anti-HDAC8-Antikörpers (17548-1-AP, Proteintech) sowie dem Sekundärantikörper anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 nachgewiesen (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.4).

Der IC₅₀-Wert der Substanz PCI-34051 gegen HDAC8 betrug 39,94 \pm 4,39 nM. Der IC₅₀-Wert von MB-669 war mit 134,00 \pm 9,16 nM im Vergleich erhöht (siehe Abbildung 34A).

In Abbildung 34B ist die HDAC8-Präzipitation aus Hek293-Zelllysate dargestellt. Die Elution wies eine Bande auf Höhe von HDAC8 nach. Die Banden-Intensität war im Vergleich zur Ausgangslösung erhöht. Im Überstand nach der Inkubation ist eine schwache Bande nachweisbar. Folglich stellt der Einsatz des Inhibitors MB-669 gekoppelt an Sepharose-Partikel eine Möglichkeit zur Präzipitation des HDAC8-Proteins dar. Weitere Banden oberhalb des HDAC8-Proteins waren nicht nachweisbar.

Im Folgenden wurden die drei anti-HDAC8-Antikörper Sc-11405 (Santa Cruz), Sc-11544 (Santa Cruz) sowie 17548-1-AP an Dynabeads (Invitrogen) gebunden und eine Immunpräzipitation mit unbehandeltem Hek293-Zelllysate durchgeführt (siehe 3.2.2.5.1; siehe Abbildung 35). Untersuchungen im Vorfeld hatten gezeigt, dass es während des Elutionsschrittes zur Dissoziation und dem Zerfall des Antikörpers kam (Daten nicht gezeigt). Da das Signal der schweren Kette des Antikörpers auf der gleichen Höhe wie das HDAC8-Protein liegt, wurde das Ergebnis maskiert. Aus diesem Grund wurde der Quervernetzer DSS

eingesetzt, um eine kovalente Bindung zwischen dem Protein G der Dynabeads (Invitrogen) und dem Antikörper zu gewährleisten.



Abbildung 35: Immunpräzipitation des HDAC8-Proteins aus Hek293-Zelllysat.

Die Antikörper Sc-11405 (Santa Cruz), Sc-11544 (Santa Cruz) sowie 17548-1-AP (Proteintech) wurden in den Konzentrationen 4 µg (Santa Cruz) bzw. 2 µg (Proteintech) mittels DSS an 25 µL Dynabeads gebunden. Das Zelllysate aus einer T25-Zellkulturflasche wurde in 50 µL Zelllysepuffer aufgenommen, die DNA mittels Benzonase für 2 h bei 4 °C verdaut und der Überstand 1:10 mit PBS verdünnt (siehe 3.2.2.1.1). Die Dynabeads wurden zur Lösung hinzugegeben und üN bei 4 °C inkubiert (siehe 3.2.2.5.1). Die Elution erfolgte für 15 min bei 95 °C und 450 rpm in 25 µL Auftragspuffer. 15 µL der Proben wurden in einer 12,5%-igen SDS-PAGE separiert und HDAC8 im Western Blot unter Verwendung der Antikörper 17548-1-AP (Proteintech) sowie anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (Licor) nachgewiesen (siehe 3.2.2.3.13.2.2.3.1 und 3.2.2.4).

Der Einsatz der drei anti-HDAC8-Antikörper Sc-11405, Sc-11544 sowie 17548-1-AP resultierte nahezu ausschließlich in einer HDAC8-Präzipitation (Abbildung 35). Die Intensität der Bande nahm vom Sc-11405 über Sc-11544 zu 17548-1-AP zu. Im Überstand war jeweils kein HDAC8-Protein nachweisbar.

Der Einsatz der drei Antikörper sowie der Sepharose/MB-669 nach einer dualen Quervernetzung mittels Formaldehyd und DSS ist in Abbildung 36 dargestellt (siehe 3.2.2.7.3). Hierzu wurde die Sepharose/MB-669 mit einem Lysat aus Hek293-Zellen inkubiert (siehe 3.2.2.1.1 und 3.2.2.5.1). Die drei Antikörper wurden zunächst an Protein G (Dynabeads, Dynal) über DSS gebunden und eine Immunpräzipitation des HDAC8-Proteins aus Hek293-Zelllysate durchgeführt.

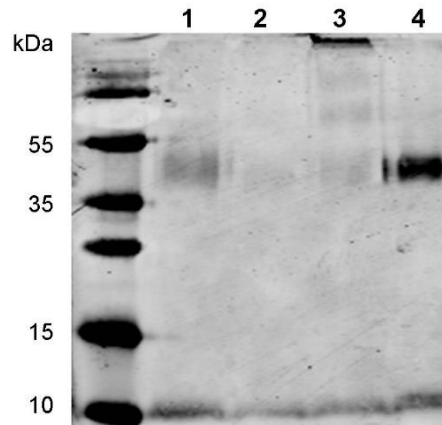


Abbildung 36: Immunpräzipitation von HDAC8 im Anschluss an das Quervernetzen mit Formaldehyd und DSS.

Die Antikörper 17548-1-AP (Proteintech; 1), Sc-11544 (Santa Cruz, 2) sowie Sc-11405 (Santa Cruz, 3) wurden in den Konzentrationen 4 μ g (Santa Cruz) bzw. 2 μ g (Proteintech) mittels DSS an 25 μ L Dynabeads gebunden (siehe 3.2.2.5.1). Das Zelllysate aus einer T25-Zellkulturflasche wurde in 50 μ L Zelllysepuffer aufgenommen, die DNA mittels Benzonase für 2 h bei 4 °C verdaut, Zelltrümmer für 10 min bei 12.000xg abzentrifugiert und der Überstand 1:10 mit PBS verdünnt (siehe 3.2.2.1.1). Die Dynabeads sowie 50 μ L der Sepharose/MB-669 (4) wurden zur Lösung hinzugegeben und üN dunkel bei 4 °C inkubiert. Die Elution erfolgte für 15 min bei 95 °C und 450 rpm in 25 μ L Auftragspuffer. 15 μ L der Proben wurden in einer 12,5%-igen SDS-PAGE separiert und HDAC8 im Western Blot unter Verwendung der Antikörper 17548-1-AP (Proteintech) sowie anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 nachgewiesen (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.4).

Die eingesetzten Antikörper besaßen eine reduzierte HDAC8-Affinität, welche auf den Quervernetzungsschritt zurückführbar war (siehe Abbildung 36). Die Immunpräzipitation unter Verwendung der Antikörper Sc-11544 sowie Sc-11405 führte zum schwachen HDAC8-Nachweis. Der Einsatz des Antikörpers 17548-1-AP resultierte in einer höheren Bandenintensität. Die stärkste Präzipitation mittels Sepharose/MB-669 führte zum HDAC8-Nachweis. Jedoch konnte auch hier keine Bande oberhalb von HDAC8 gezeigt werden.

4.3.1.3 Co-Präzipitation

Das HDAC8-Protein wurde in *E.coli* XL1-Blue-Zellen über den Vektor pQE70-HDAC8 exprimiert und im Anschluss an eine Ammoniumsulfatfällung bei einer Sättigung von 40% im IMAC-Verfahren eingesetzt (siehe 3.2.2.5.3). Dies resultierte in einer vom natürlichen Vorkommen der Zelle unabhängigen definierten HDAC8-Menge. Potentielle Interaktionspartner der HDAC8 wurden in einer Konzentration von ca. 10 mg/mL aus Hek293-Zellen über eine Zelllyse extrahiert und auf eine mit HDAC8-Protein beladene Säule im IMAC-Verfahren eingesetzt (siehe Abbildung 37).

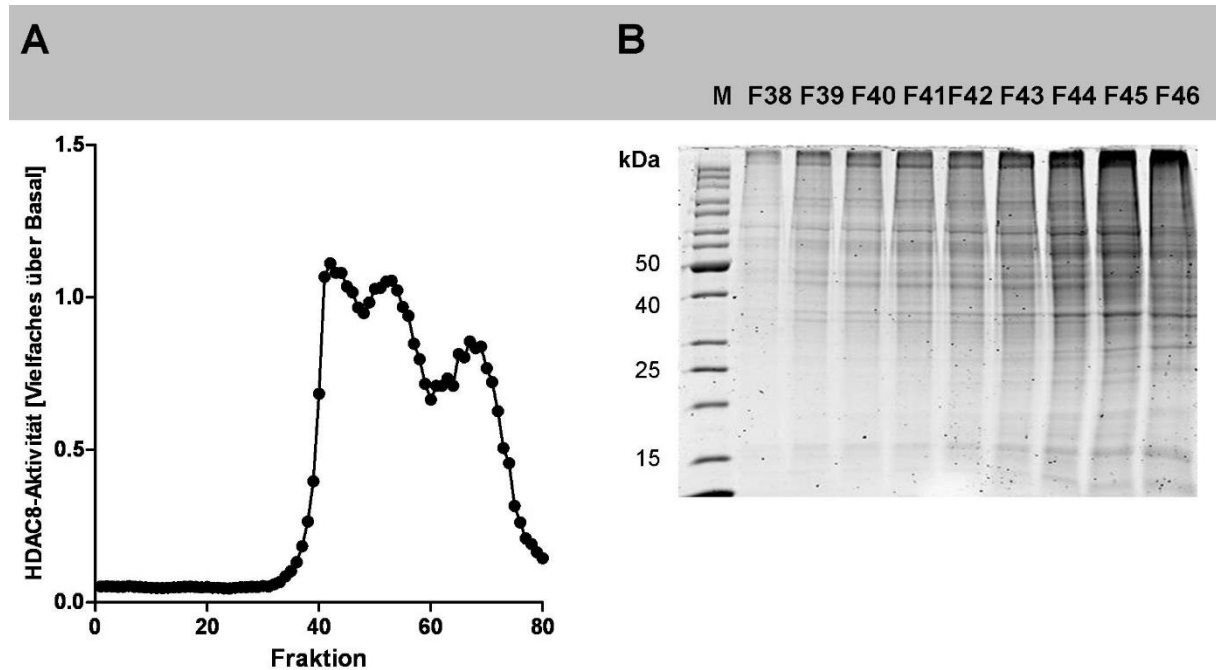


Abbildung 37: Co-Präzipitation zur Identifikation von HDAC8-Bindungspartnern.

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue-Zellen (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer ÜN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 4 L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer ÜN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 40% Sättigung durchgeführt (siehe 3.2.6.2.3) und 30 mL des Lysats im IMAC-Verfahren eingesetzt. Zur Reduzierung von unspezifischen Bindungen wurde zunächst mit 50 mL 40 mM und anschließend mit 30 mL 200 mM Imidazol-Lösung gespült. Das überschüssige Imidazol wurde mit 30 mL HDAC8-Puffer entfernt (siehe 3.2.2.5.3).

Hek293-Zellen aus fünf T175-Flaschen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, in PBS abgelöst und in 5 mL Zelllysepuffer aufgenommen. Die Inkubation erfolgte 2 h bei 4 °C, wobei der DNase-Verdau mit 10 µL Benzonase durchgeführt wurde (siehe 3.2.2.1.1). Der Überstand wurde 1:6 mit HDAC8-Puffer verdünnt und in der IMAC eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation ÜN bei 4 °C, unspezifische Interaktionen wurden mit 30 mL HDAC8-Puffer entfernt und die Co-Elution in 80 Fraktionen a 150 µL mit 1 M Imidazol durchgeführt.

Der Überstand wurde im 2-Schritt-Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) eingesetzt (A) und der Proteingehalt in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) erfasst (B). Die Aktivität wurde auf die Ausgangslösung normiert und diese auf 1 gesetzt ($n=1$).

Wie in Abbildung 37 dargestellt konnte eine HDAC8-Aktivität in den Fraktionen 38 bis 78 nachgewiesen werden, wobei die SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung in den Fraktionen 38 bis 48 eine separierbare Proteinmenge zeigte.

Es sollte nun geklärt werden, ob es sich bei den eluierten Proteinen um Interaktionspartner der HDAC8 oder unspezifische Bindungen an das Säulenmaterial handelt. Hierzu wurde ein Co-Präzipitation (siehe 3.2.2.5.3) ohne rekombinantes HDAC8-Protein bei gleichen Bedingungen durchgeführt (siehe Abbildung 38).

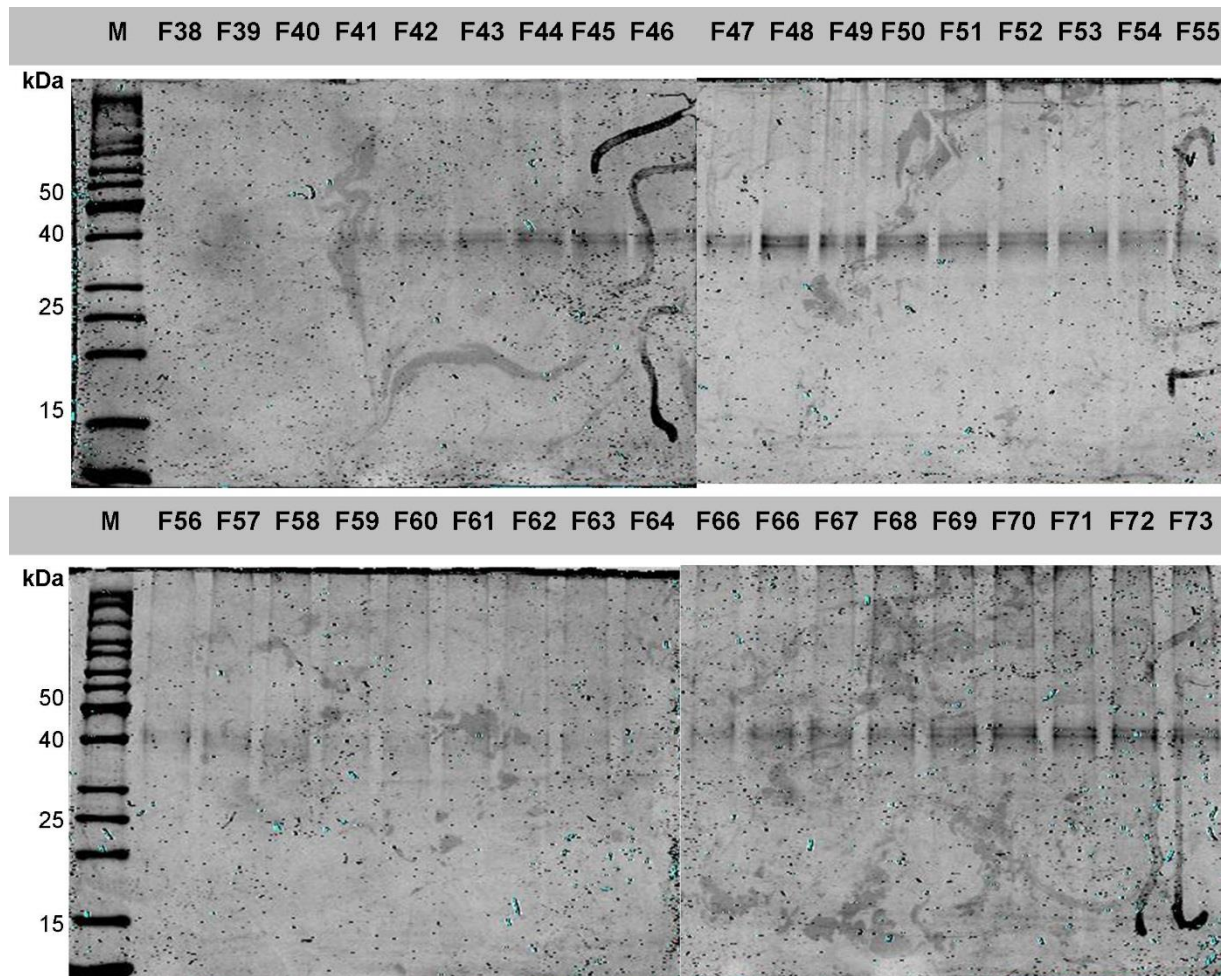


Abbildung 38: Kontroll-Co-Präzipitation zur Identifikation von HDAC8-Bindungspartnern.

Zur Erfassung von unspezifischen Proteininteraktionen aus Hek293-Zellen mit dem Säulenmaterial wurde eine adaptierte Co-Präzipitation ohne rekombinantes HDAC8-Protein durchgeführt (siehe 3.2.2.5.3).

Hek293-Zellen aus fünf T175-Flaschen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, in PBS abgelöst in 5 mL Zellysepuffer aufgenommen. Die Inkubation erfolgte 2h bei 4 °C, wobei der DNase-Verdau mit 10 µL Benzonase durchgeführt wurde (siehe 3.2.2.1.1). Der Überstand wurde 1:6 mit HDAC8-Puffer verdünnt und in der IMAC eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation ÜN bei 4 °C, unspezifische Interaktionen wurden mit 30 mL HDAC8-Puffer entfernt und die Elution in 80 Fraktionen a 150 µL mit 1 M Imidazol durchgeführt. Der Überstand wurde in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung eingesetzt (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2).

Abbildung 38 zeigt die unspezifisch an das Säulenmaterial assoziierten Proteine. Es konnte eine Bande auf Höhe von ca. 40 kDa nachgewiesen werden. Oberhalb und unterhalb wurden keine deutlichen Banden gezeigt

In einer Dreifach-Bestimmung wurde jeweils die Spur der Fraktion 45 sowohl aus dem Kontroll- als auch aus der Co-Präzipitation der SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung wurde in 10 Banden aufgeteilt und mittels der Methode Peptide Mass Fingerprinting (PMF) analysiert (siehe 3.2.2.6). Die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.3.1 und 3.2.2.3.2) sowie die Aktivitäten (siehe 3.2.4.1) der einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 39 dargestellt.

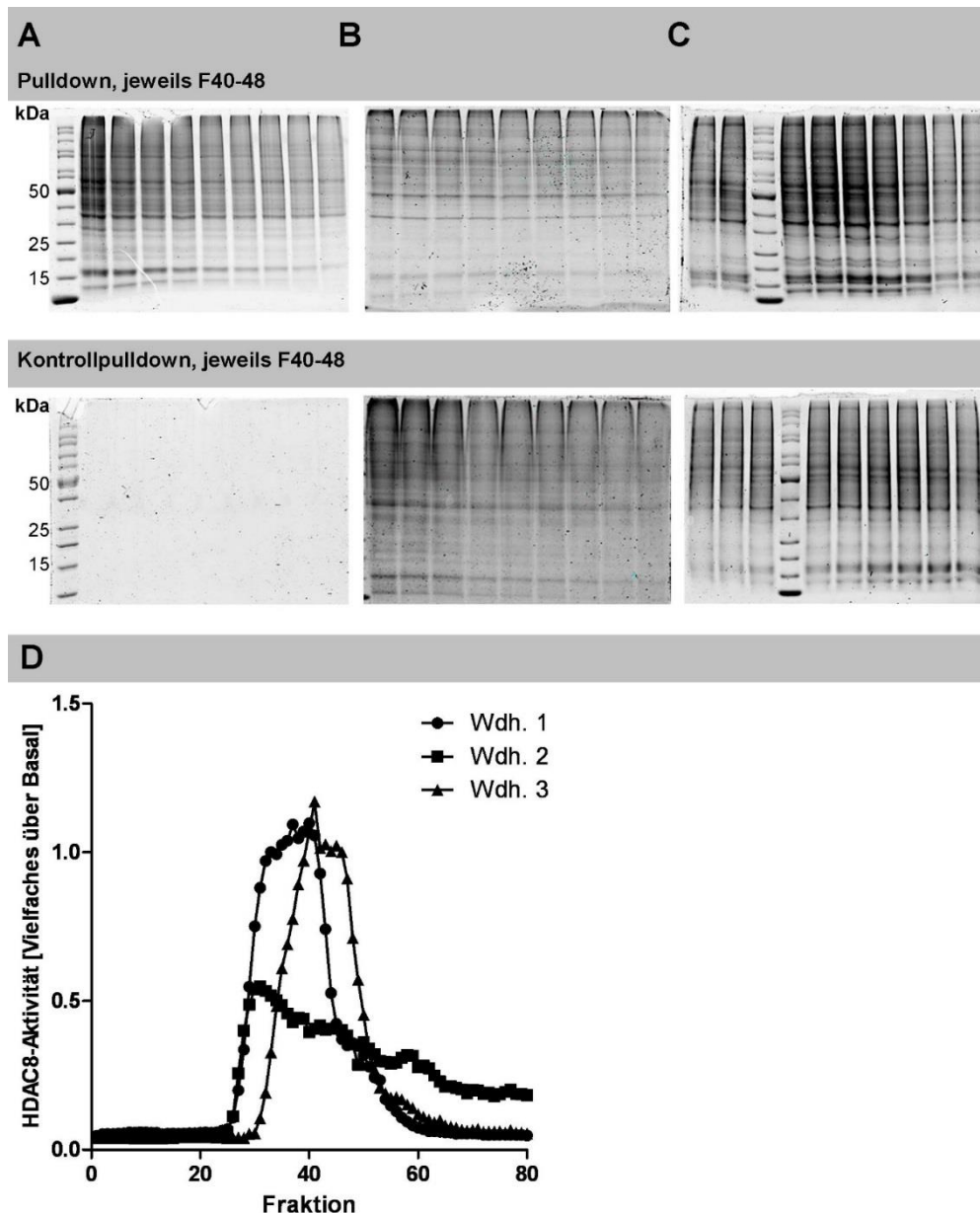


Abbildung 39: Identifikation von HDAC8-Protein-Interaktionen mittels Co-Präzipitation (Wiederholung 1 bis 3).

Eine Vorkultur wurde mit *E.coli* XL-1 Blue-Zellen (transformiert mit pQE70-HDAC8) angeimpft und nach einer üN-Inkubation bei 37 °C und 450 rpm in 4 L LB-Medium überführt. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 3.2.6.2.1). Nach einer üN-Kultivierung bei 37 °C und 450 rpm erfolgte der Zellaufschluss mit Ultraschall (siehe 3.2.6.2.2). Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 40% Sättigung durchgeführt (siehe 3.2.6.2.3) und 30 mL des Lysats im IMAC-Verfahren eingesetzt. Das Imidazol wurde mit 30 mL HDAC8-Puffer entfernt (siehe 3.2.2.5.3).

Hek293-Zellen aus fünf T175-Flaschen wurden in 5 mL Zelllysat 2h bei 4 °C lysiert, wobei der DNase-Verdau mit 10 µL Benzonase durchgeführt wurde (siehe 3.2.2.1.2). Der Überstand wurde 1:6 mit HDAC8-Puffer verdünnt und in der IMAC eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation üN bei 4 °C, unspezifische Interaktionen wurden mit 30 mL HDAC8-Puffer entfernt und die Co-Elution wurde in 80 Fraktionen a 150 µL mit 1 M Imidazol durchgeführt. Die Kontroll-Co-Präzipitation erfolgte analog ohne rekombinantes HDAC8-Protein.

Der Überstand der Wiederholungen 1 (A), 2 (B) sowie 3 (C) wurde im Zwei-Schritt-Aktivitätstest unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$) eingesetzt und der Proteingehalt in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung erfasst (siehe 3.2.2.3.1, 3.2.2.3.2 und 3.2.4.1). Die Aktivität wurde auf die Ausgangslösung normiert und diese auf 1 gesetzt (n=1).

Wie in Abbildung 39 dargestellt, wies die Kontrollexperimente der Co-Präzipitation 3 und 4 eine deutlich höhere Proteinmenge auf. Aus diesem Grund wurde eine weitere Wiederholung nach Austausch des Säulenmaterials sowie aller Lösungen durchgeführt, um so eine potentielle Kontamination bzw. ein fehlerhaftes Ansetzen ausschließen zu können. Das Ergebnis entsprach jedoch den beiden Experimenten 3 und 4 (Daten nicht gezeigt).

Es sollte nun geklärt werden, ob ein Einfluss der Zellysemethode auf die Assoziation von unspezifischen Bindungen an das Trägermaterial bestand. Eine Ursache für das divergente Bild könnte eine mangelnde Reduktion von festen Bestandteilen wie Zelltrümmern sein. Hierzu wurde im Anschluss an den Zellaufschluss ein weiterer Zentrifugationsschritt eingeführt und trotz der Gefahr von Proteinassoziationen das Lysat bei einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Auch hier wurden die Ergebnisse aus den Co-Präzipitation-Experimenten 3 und 4 bestätigt.

Aus diesem Grund wurden ausschließlich die beiden ersten Experimente ausgewertet. Hierzu wurden anhand eines Mascot-Abgleiches mit einer Datenbank den Peptidfragmenten die entsprechenden Proteine zugeordnet. Wiederbestätigte Proteine, die nicht in den Kontrollversuchen nachgewiesen werden konnten, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung des Proteinnachweises der Co-Präzipitationen 1 und 2 unter Verwendung der PMF-Methode zur Identifikation von HDAC8-Proteininteraktionen.

Pubmed (GI)	Bezeichnung
28614	aldolase A [Homo sapiens]
28940	unnamed protein product [Homo sapiens]
35505	pyruvate kinase [Homo sapiens]
36796	t-complex polypeptide 1 [Homo sapiens]
37492	alpha-tubulin [Homo sapiens]
49868	put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus]
178277	S-adenosylhomocysteine hydrolase [Homo sapiens]
193983	hsp70A1 [Mus musculus]
4503481	elongation factor 1-gamma [Homo sapiens]
4885281	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor [Homo sapiens]
5031753	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H [Homo sapiens]
14043072	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform B1 [Homo sapiens]
188595808	Chain A, Nmr Structure Of Chaperone Chz1 Complexed With Histone H2a.Z-H2b

4.3.2 Identifikation von HDAC8-Substraten

4.3.2.1 Chip-basierter Nachweis von HDAC8-Substraten

Auf einem Trägermaterial wurden die Peptide synthetisiert, die zunächst mittels Acetyl-NHS selektiv am Lysinrest acetyliert und anschließend mit rekombinant hergestelltem HDAC8-Protein inkubiert wurden (siehe 3.2.3). Zusätzlich wurden noch zwei Kontroll-Peptide in einer bestimmten Anzahl an Replikaten aufgebracht. Diese verfügten alternierend über zwei (DYKDDDDKGG) Lysinreste bzw. keinen (YPYDVDPDYAG) Lysinrest. Zu variierende Parameter waren hier neben dem Trägermaterial die Acetylierungsmethode sowie das Nachweisprinzip.

4.3.2.1.1 Nachweis der Acetylierung von Peptiden

Zur Etablierung des Nachweisprinzips und der Evaluierung der Acetylierbarkeit der Peptide wurden zunächst auf einen PEGMA (Polyethylenglycol Methacrylatpolymer)/PMMA (Polymethylmethacrylat)- (10/90)-Träger die beiden Kontrollpeptiden DYKDDDDKGG (FLAG-Motiv, grün), YPYDVDPDYAG (HA (Haemagglutinin)-Motiv, rot) sowie weitere Sequenzvarianten aufgetragen (siehe 3.2.3).

Der Nachweis der Acetylierung erfolgte über einen anti-AcLys-Antikörper (polyklonaler Kaninchenantikörper von Cell Signalling) und einem DyLight680-markierten Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Thermo Scientific). Es wurde zunächst festgestellt, ob eine Acetylierung der Lysin-Seitenketten des FLAG-Epitops (grün) in einer Reduzierung der Antikörperaffinität gegen das Epitop und folglich in einer Abnahme des Messsignals resultiert (siehe Abbildung 40).

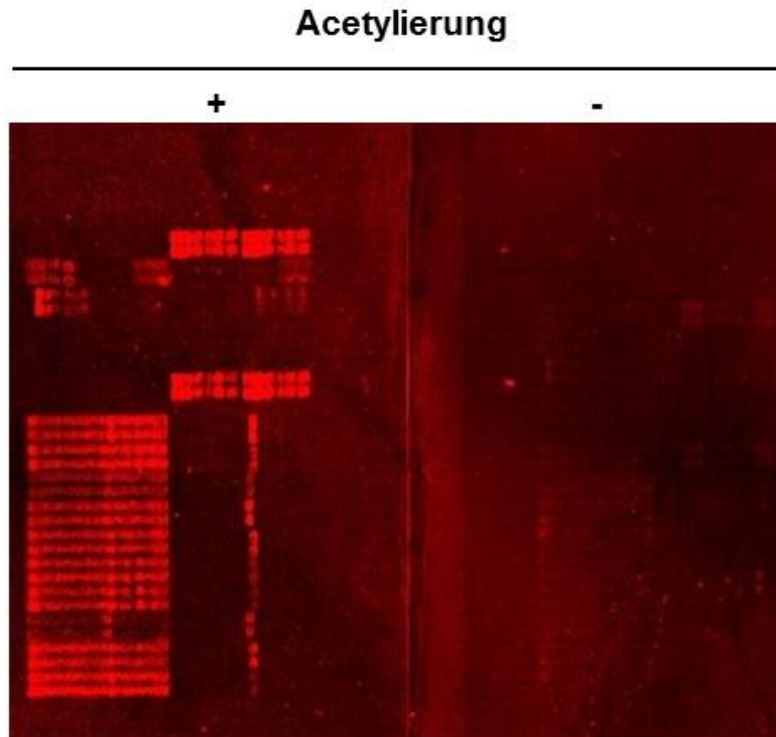


Abbildung 40: Evaluierung des Nachweisprinzips der Acetylierung von Peptidsequenzen.

Auf PEGMA/PMMA (10/90)-beschichtete Glaträger wurden Kontrollpeptide (DYKDDDDKGG, FLAG-Motiv; YPYDVPDYAG, HA-Motiv) und weitere Sequenzvarianten synthetisiert und mittels Acetyl-NHS-Ester acetyliert (siehe 3.2.3). Der Nachweis erfolgte mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070. Die Detektion des Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000, 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070) wurde bei 700 bzw. 800 nm durchgeführt.

Der Acetyl-Lysin-Antikörper zeigte eine homogene Färbung der FLAG-Peptide, die ohne Behandlung mit dem NHS-Ester nicht nachweisbar war. Darüber hinaus sprechen für eine spezifische Lysin-Acetylierung die fehlende Anfärbung der nicht acetylierbaren HA-Peptide (siehe Abbildung 40).

Mehrfach durchgeführte Messungen der Chips zeigten ein stabiles Signal, wobei es auf Grund von Photobleich-Effekten nach mehrmaligem Messen zu einer Signalabschwächung kam (Daten nicht gezeigt).

4.3.2.1.2 Einfluss des Trägermaterials auf die Acetylierbarkeit von Peptiden und Nachweis der Deacetylierbarkeit

Das Trägermaterial kann Einfluss auf die Acetylierbarkeit der Peptide bzw. den Nachweis der Acetylierung nehmen. Aus diesem Grund wurden randomisierte, bekannte sowie Kontroll-Peptidsequenzen (1. Reihe oben und 1. Spalte links) auf die Oberflächen PEGMA/PMMA-10/90, Spacer: 2 β Ala sowie EG (Ethylenglycol)3-Silan aus Toluol/Monolayer synthetisiert, mit 1 mM Acetyl-NHS in PBST (pH 7,4) μ N bei RT acetyliert und diese Acetylierung unter

Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Ac-Lys nachgewiesen (siehe 3.2.3; Abbildung 41: Einfluss des Trägermaterials auf den Nachweis der Acetylierbarkeit.

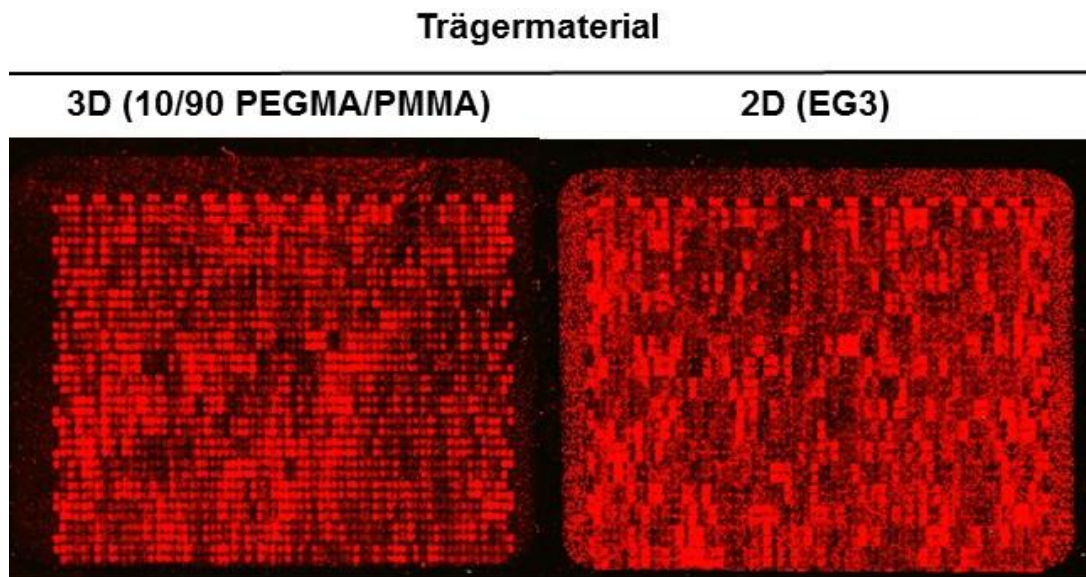


Abbildung 41: Einfluss des Trägermaterials auf den Nachweis der Acetylierbarkeit.

Glasträgern beschichtet mit 1 (PEGMA/PMMA-10/90, Spacer: 2 β Ala) und 3 (EG3-Silan aus Toluol/Monolayer) wurden Kontrollsequenzen (1. Reihe oben und 1. Spalte links) und weitere Peptide synthetisiert und mit 1 mM Acetyl-NHS in PBST (pH 7,4) üN bei RT acetyliert (siehe 3.2.3). Der Nachweis erfolgte mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070. Die Detektion des Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000, 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070) wurde bei 700 nm durchgeführt (siehe 3.2.3).

Es zeigte sich ein Einfluss auf das Messsignal der Acetylierung durch die jeweilige Oberfläche (siehe Abbildung 41), wobei 2D bzw. 3D den Aufbau der Beschichtung beschreibt. So besaß die 3D-Oberfläche eine gesteigerte Höhe. So ist die unspezifische Hintergrundfärbung von Material 1 geringer als von 3. Des Weiteren unterscheidet sich die Signalintensität der einzelnen Peptide. Ursache hierfür können Sequenz-spezifische Syntheseausbeuten jedoch auch Unterschiede in der Acetylierungseffizienz sein.

Die Deacetylierbarkeit von zunächst acetylierten Peptiden sollte für die beiden Trägermaterialien 1 und 3 gezeigt werden. Hierfür wurden randomisierte, bekannte sowie Kontroll-Peptidsequenzen (1. Reihe oben und 1. Spalte links) mit 1 mM Acetyl-NHS in PBST (pH 7,4) üN bei RT acetyliert (siehe 3.2.3) und anschließend mit rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2) ebenfalls üN inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti-AcLys-Antikörper. Als Positivkontrolle diente das FLAG- (zwei Lysinreste) und als Negativkontrolle das HA-Motiv (kein Lysinrest) (siehe Abbildung 42).

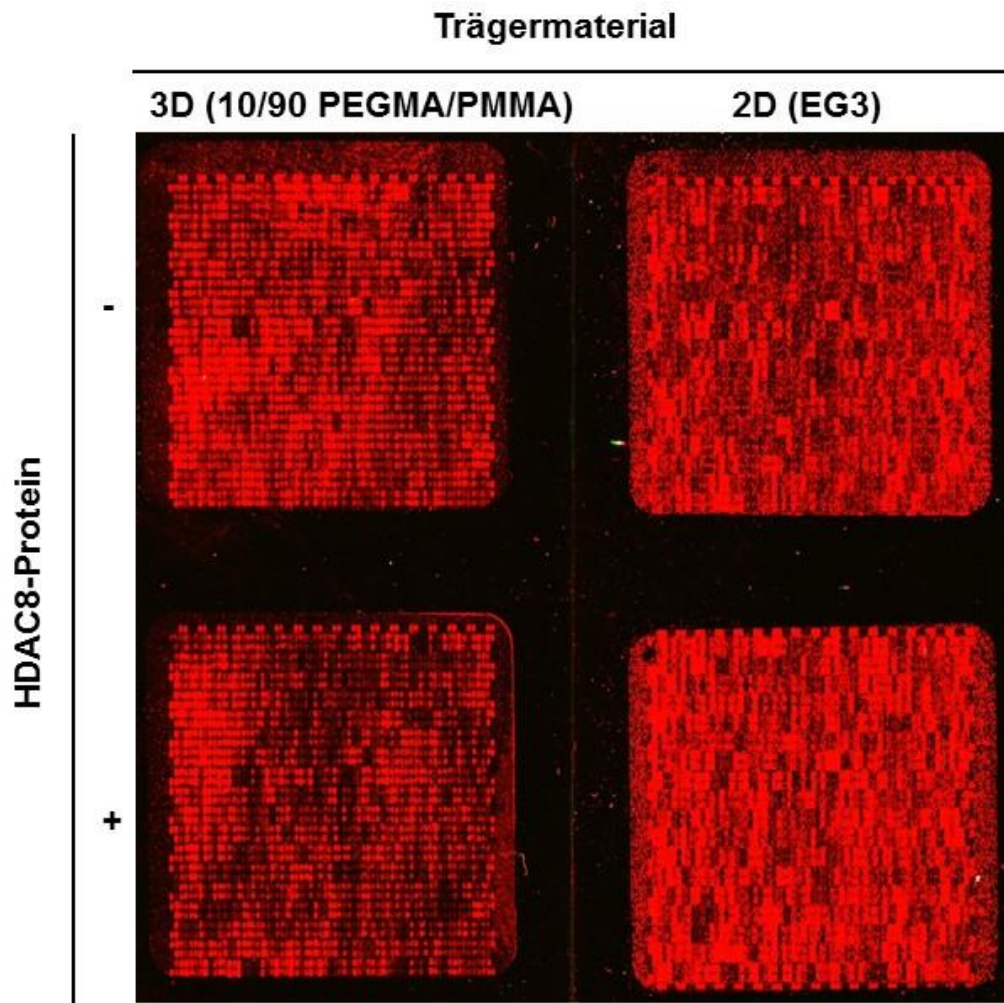


Abbildung 42: Einfluss der Trägermaterialien 10/90 PEGMA/PMMA sowie EG3 auf die HDAC8-Deacetylierbarkeit.

Auf Glasträger beschichtet mit den Materialien 1 (PEGMA/PMMA-10/90, Spacer: 2 β Ala) sowie 3 (EG3-Silan aus Toluol/Monolayer) wurden jeweils Kontrollsequenzen (1. Reihe oben und 1. Spalte links) und weitere Peptidsequenzen synthetisiert, mittels NHS-Ester acetyliert (1 mM Acetyl-NHS in PBST pH 7,4, μ N, RT und anschließend mit rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem HDAC8-Protein μ N inkubiert (siehe 3.2.6.2). Der Nachweis erfolgte mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1 h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070. Die Detektion des Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000, 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070) wurde bei 700 nm durchgeführt (siehe 3.2.3).

Einhergehend mit Abbildung 42 wurde hier ebenfalls eine erhöhte Hintergrundfärbung des Trägermaterials 3 nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte sich eine vereinzelte Zunahme des Messsignals nach der Deacetylierung durch das HDAC8-Protein. Dies könnte auf einer unspezifischen Material-abhängigen Färbung beruhen.

Wie erwartet zeigten die beiden Kontrollen (HA- bzw. FLAG-Motiv) das entsprechende Färbeverhalten. So konnte ausschließlich ein Signal für das FLAG-Motiv nachgewiesen werden, da das HA-Motiv über keinen Lysinrest verfügt.

Grundlage des Vergleiches vor und nach der Inkubation mit dem HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2) waren die Intensitätsmessungen des Trägermaterials 1. Die Auswertung erfolgte mit

der Software PepSlide Analyzer der Firma SICASYs GmbH. Der Hintergrund der Messwerte wurde zunächst abgezogen, diese Werte auf den Mittelwert der Gesamtchipintensität normiert und aus den Replikaten der Mittelwert bestimmt. Die Ergebnisse der aus der Acetylomforschung bekannten Sequenzen sind in Abbildung 43 dargestellt. Aufgetragen sind jeweils die Originalsequenzen und bei Vorhandensein von mehreren Lysinen der jeweilige Austausch gegen Arginin. Die Werte nach der HDAC8-Inkubation wurden auf die Ausgangswerte bezogen, wobei 1 keine Veränderung der Peptidacetylierung und 0 eine vollständige Deacetylierung darstellt.

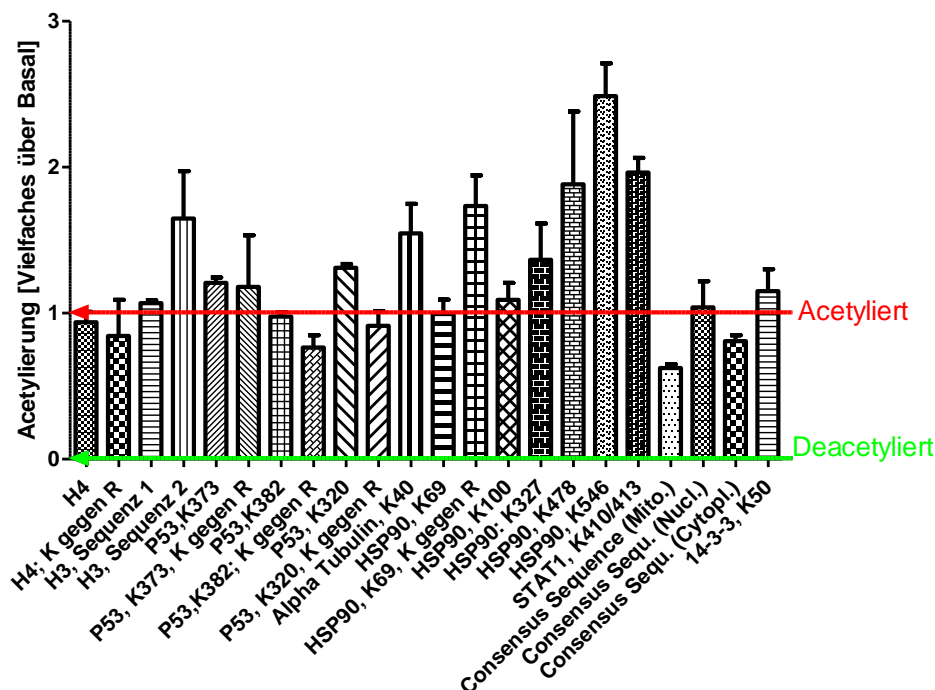


Abbildung 43: Deacetylierung von Peptiden durch das HDAC8-Protein.

Im Anschluss an die Deacetylierungsreaktion mit rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2) erfolgte der Nachweis der Peptidintensitäten mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1 h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070 (siehe 3.2.3). Die Detektion des Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000, 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070) wurde bei 700 nm durchgeführt. Von den Intensitäten wurde zunächst der Hintergrund abgezogen, diese dann auf die Gesamtchipintensität normiert und die Intensität nach der Deacetylierung auf die Intensität vor der Deacetylierung bezogen (dargestellt als Vielfaches über Basal). Die Werte sind Mittelwerte (mean)±SEM, n = mind. 2 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das verwendete Symbol).

Die spezifische Deacetylierung eines Substrates durch das HDAC8-Protein sollte in einer Senkung des Messsignals resultieren, da die Bindung des eingesetzten anti-AcLys-Antikörpers verringert war. Abhängig von der Affinität des Antikörpers gegenüber dem Peptid kam es zu unterschiedlichen Ausgangswerten, was das Einbeziehen des Ausgangssignals notwendig machte. Eine vollständige Deacetylierung sollte zu einer Abnahme des Signals auf 0 resultieren.

Die aus der Acetylomforschung bekannten Peptide zeigten sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Intensität infolge der Deacetylierung (siehe Abbildung 43). Eine Zunahme des Signals legt einen unspezifischen Antikörper-Nachweis bzw. eine ungleichmäßige Acetylierung der Peptidsequenzen nahe, da durch die Behandlung keine Steigerung der Acetylierung entstehen kann. Des Weiteren ist es möglich, dass an die Oberfläche assoziierte HDAC8-Proteine nicht vollständig entfernt und eventuell durch den Antikörper erkannt wurden. Es wurde für kein Peptid eine signifikante Abnahme des Messsignals im Vergleich zu einer vollständigen Acetylierung von 1 gezeigt. Jedoch konnte für die beiden Peptide der Proteine p53 und der Konsensus-Sequenz (mito) eine tendenzielle Abnahme beobachtet werden. Der Austausch benachbarter Lysin-Reste gegen Arginine führte zu keinem signifikanten Unterschied.

4.3.2.1.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Acetylierungseffizienz

Der pH-Wert kann Einfluss auf die Acetylierungsreaktion nehmen. Aus diesem Grund wurden mit dem bisher verwendeten Layout die Peptide auf die Oberflächen PEGMA/PMMA-10/90, Spacer: 2 β Ala synthetisiert (siehe 3.2.3), bei den pH-Werten 7,4, 8,3 sowie 9,2 mit 1 mM Acetyl-NHS in PBTS (pH 7,4) üN bei RT acetyliert und diese Acetylierung durch den Primärantikörper anti-AcLys sowie den IRDye680-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (siehe Abbildung 44).

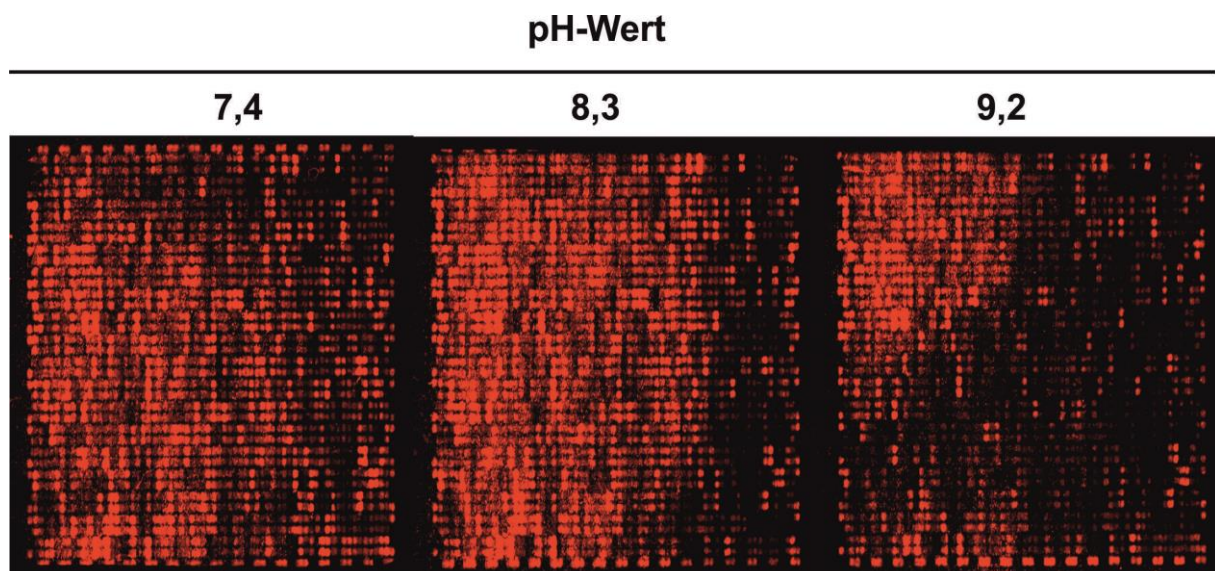


Abbildung 44: Einfluss des pH-Wertes auf die Acetylierungseffizienz von Peptidlysinen.

Auf die Oberfläche PEGMA/PMMA-10/90 (Spacer: 2 β Ala) wurden Kontroll (1. Reihe oben und 1. Spalte links)- und weitere Peptidsequenzen synthetisiert und die Acetylierung bei den pH-Werten 7,4, 8,3 sowie 9,2 durchgeführt (1 mM Acetyl-NHS in PBST, üN, RT). Der Nachweis erfolgte mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1 h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070. Die Detektion des Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000, 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070) wurde bei 700 nm durchgeführt (siehe 3.2.3).

Wie in Abbildung 44 dargestellt zeigte sich eine partielle Abnahme der Signalintensität mit steigendem pH-Wert. Dies spricht für eine Verschlechterung der Acetylierungseffizienz bei erhöhtem pH-Wert und legt die Vermutung nahe, dass die erfassten Unterschiede auf anderen Ursachen beruhen. So kann auch die Aminosäureumgebung des zu acetylierenden Lysins eine Rolle spielen. Die Erfassung des Verhältnisses vor und nach der Inkubation mit dem HDAC8-Protein lässt jedoch die Verwendung der Methode prinzipiell zu. Die Acetylierung sollte in den darauf folgenden Versuchen bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt werden.

4.3.2.1.4 Vergleich einer Direktmarkierung mit dem DyLight680 NHS Ester mit dem immunologischen Nachweis der Lysin-Acetylierung

Die Direktmarkierung mit dem Dylight 680 NH Ester wurde im folgenden immunologischen Nachweis über den anti-AcK-Antikörper verglichen. Hierzu wurde auf Glaträger die beiden Beschichtungen 10/90 PEGMA/PMMA und EG3 aufgetragen, verschiedene Peptidsequenzen synthetisiert, diese acetyliert und mit rekombinant exprimiertem, aufgereinigtem HDAC8-Protein inkubiert (siehe Abbildung 45).

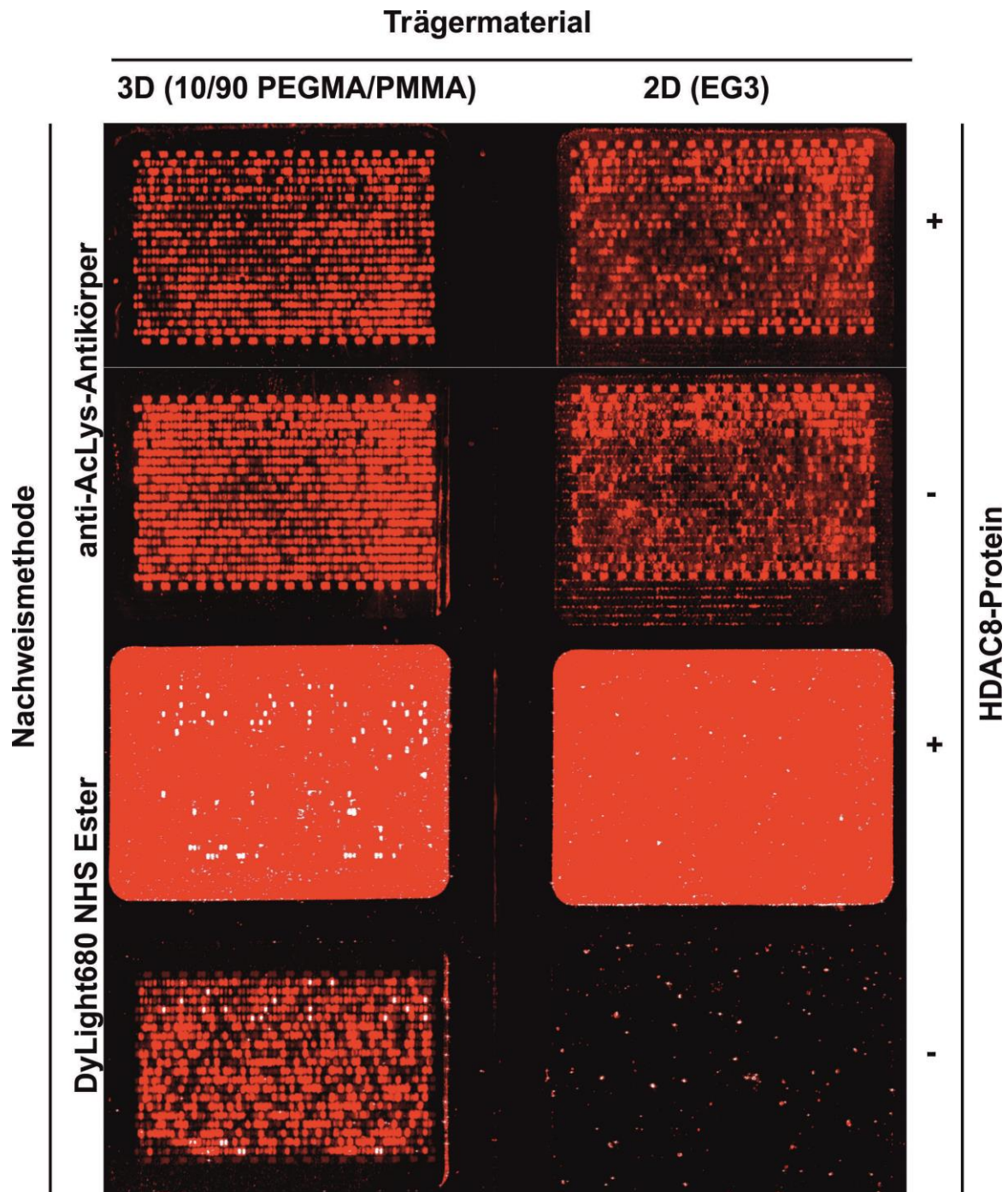


Abbildung 45: Einfluss des Nachweisprinzips auf die Detektion der Lysin-Deacetylierung von Peptiden durch das HDAC8-Protein.

Kontroll (1. Reihe oben und 1. Spalte links)– und weitere Peptidsequenzen wurden auf die Trägermaterialien 10/90 PEGMA/PMMA bzw. EG 3 synthetisiert (siehe 3.2.3), gestaffelt mit 5 mM Acetyl-NHS in PBST (pH 7,4) für 16 h bei RT und weitere 4 h bei RT acetyliert. Die Träger wurden mit 1 mL HDAC8-Protein für 16 h bei RT und nach einem Lösungswechsel gegen 0,5 ml frisches Enzym für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert (siehe 3.2.6). Der Nachweis mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) erfolgte nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1 h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070. Der Primärantikörpernachweis wurde mit dem Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000) für 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070 durchgeführt. Alternativ wurden die Träger nach der Inkubation mit HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2.3) mit DyLight680 NHS-Ester (1:20000 in PBST) für 2 h bei RT behandelt. Die Detektion erfolgte jeweils mit dem Licor Odyssey bei entsprechender Wellenlänge.

Wie in Abbildung 45 dargestellt, zeigte die Detektion mittels anti-AcLys-Antikörper erneut ein gleichmäßigeres Signal des 2D- im Vergleich zum 3D-Trägermaterial. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen die Resultate des Materials 10/90 PEGMA/PMMA verwendet.

Der Direktnachweis wies vor der Inkubation mit dem HDAC8-Protein eine geringe Färbung für die 2D-Oberfläche und eine stärkere, ungleichmäßige für die 3D-Oberfläche auf. Die Detektion der freien Aminofunktion von deacetylierten Lysinen ergab nach der Proteininkubation eine unspezifische Färbung beider Trägermaterialien.

4.3.2.1.5 Reproduzierbarkeit der Peptiddeacetylierung durch das HDAC8-Protein

Zwei weitere Wiederholungen wurden unter den genannten Bedingungen durchgeführt (siehe 3.2.3). Der Hintergrund wurde zunächst von den Messsignalen abgezogen und die Werte anschließend auf das Chipgesamtsignal normiert. Aus dem Ergebnis vor und nach der Deacetylierung wurde das Verhältnis bestimmt und dieses als Vielfaches über Basal dargestellt. Der Vergleich der Daten ist in Abbildung 46 dargestellt. Dies sollte der Erfassung der Reproduzierbarkeit dienen.

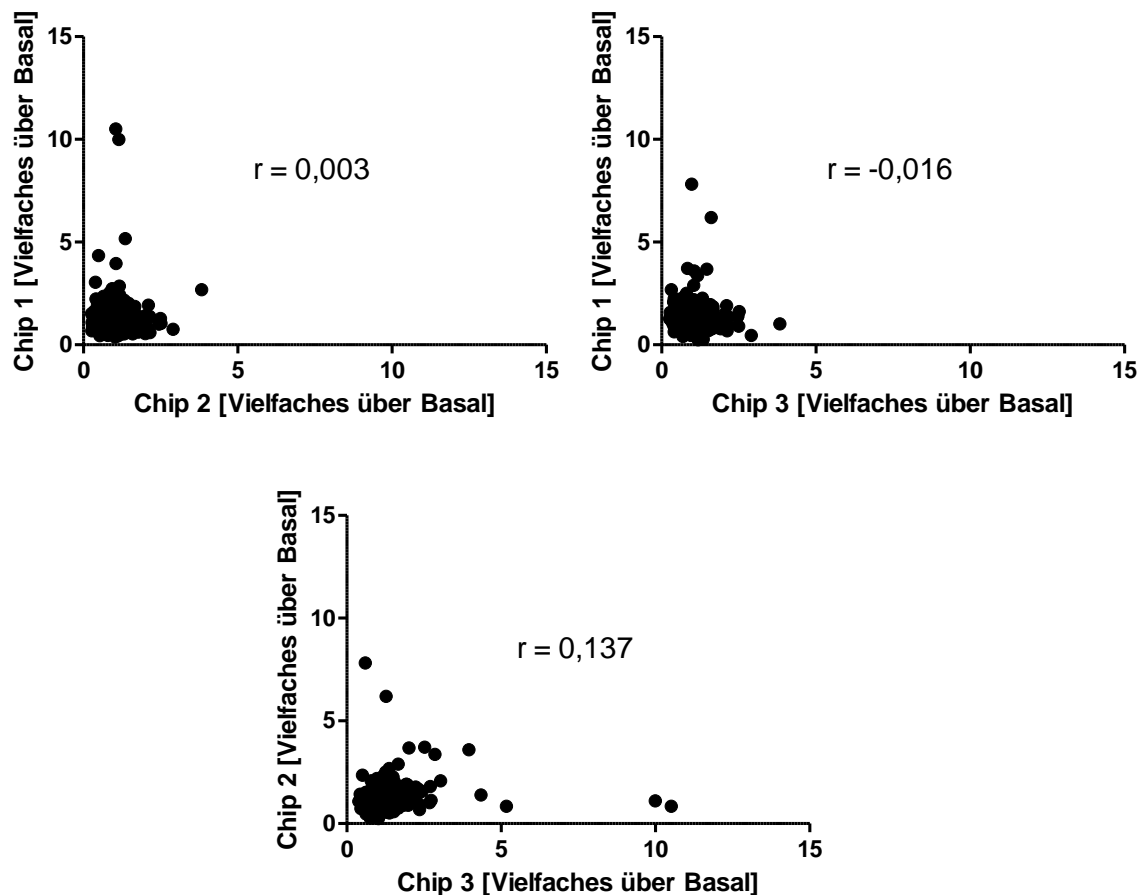


Abbildung 46: Reproduzierbarkeit der Sequenz-spezifischen Deacetylierung von acetylierten Lysinen in Peptiden durch das HDAC8-Protein.

In drei Replikaten wurden Kontrollsequenzen (1. Reihe oben und 1. Spalte links) und weitere Peptidsequenzen auf das Trägermaterial 10/90 PEGMA/PMMA aufgebracht und gestaffelt mit 5 mM Acetyl-NHS in PBST (pH 7,4) für 16 h bei RT sowie weitere 4 h ebenfalls bei RT acetyliert (siehe 3.2.3). Die Träger wurden mit 1 mL HDAC8-Protein für 16 h bei RT und nach einem Lösungswechsel gegen 0,5 ml frisches Enzym (siehe 3.2.6) für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti-AcLys-Antikörper (1:500) nach einem zweistündigem Blockierschritt mit Rockland MB-070 für 1 h bei RT in PBST (pH 7,4) und 10% Rockland MB-070. Die Detektion des Ziege anti-Hase IgG(H+L) conj. DyLight680 (1:5000, 30 min bei RT in PBST (pH 7,4) + 10% Rockland MB-070) wurde bei 700 nm durchgeführt. Das Signal der Hintergrundfärbung wurde jeweils vom Peptidsignal abgezogen, dieses auf den Mittelwert der Chipgesamtintensität normiert und das Verhältnis zwischen vor und nach der Deacetylierungsreaktion gebildet. r (Korrelationsfaktor).

Eine vollständige Acetylierung sollte in einem Wert von 1 resultieren. Die Intensitäten nach der Deacetylierung lag in einigen Fällen größer 1, was der Methode widersprach (siehe Abbildung 46). Des Weiteren sollte ein reproduzierbares Ergebnis in einem linearen Verlauf der Messwerte zwischen 0 und 1 sowie einem Korrelationsfaktor (r) nahe 1 resultieren. Da jedoch der Großteil der Ergebnisse von dieser Linearität abwichen und die Korrelationsfaktoren von 0,003 (Chip 1 gegen Chip 2), -0,016 (Chip 1 gegen Chip 3) bzw. 0,137 (Chip 2 gegen Chip 3) aufwiesen, musste von keiner Reproduzierbarkeit ausgegangen werden.

4.3.3 Die Histone H2A, H2B sowie H3 als Substrate der HDAC8

4.3.3.1 Synthese von acetyliertem Lysin

Als kostengünstige Alternative wurde die Produktion von ϵ -N-Lys(Ac)-OH nach Dose *et al.* (2011) durch Benjamin Horstmann (Arbeitsgruppe Meyer-Almes, Hochschule Darmstadt) etabliert (siehe 3.2.5.2). Das Acetyl-Lysin wurde zur Expression von mono-acetylierten Histonvarianten eingesetzt. Hier wurde zunächst der α -Stickstoff der Peptidbindung durch eine Komplexierung mit Kupfer geschützt und anschließend die spezifische Acetylierung des α -Stickstoffes mit Essigsäureanhydrid durchgeführt. Die Dekomplexierung erfolgte durch Zugabe von 8-Hydroxyquinoline. In Abbildung 47 ist das NMR-Spektrum einer Produktion exemplarisch dargestellt.

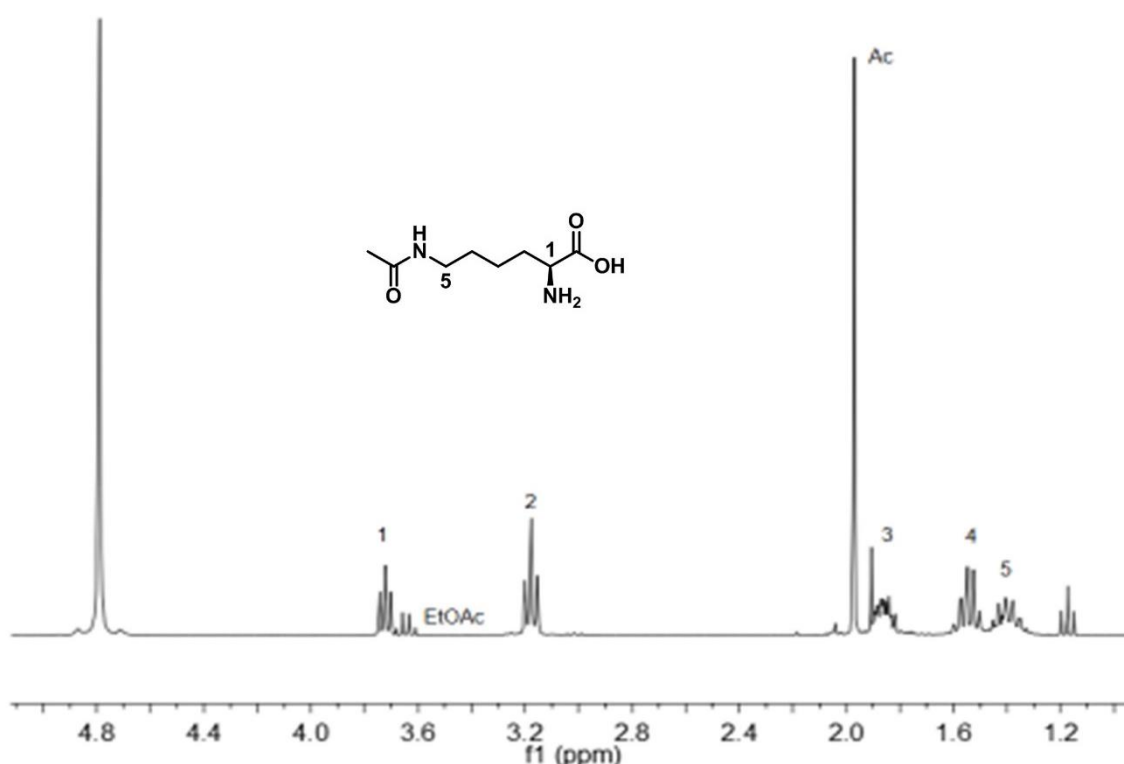


Abbildung 47: NMR-Spektrum der Synthese von ϵ -N-Lys(Ac)-OH nach Dose *et al.* (2011).

Zur Produktion von ϵ -N-Lys(Ac)-OH wurden Lysin und Kupfersulfat in einer 1 M Natriumhydrogencarbonat gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Essigsäureanhydrid gestartet und 48 h reagieren gelassen. Die Kristalle wurden abfiltriert, und das Filtrat erneut für 24 h in der Reaktion eingesetzt. Nach einem weiteren Filtrationsschritt erfolgte die Dekomplexierung mit Hydroxyquinolin für 24 h. Die Kristalle wurden eigenengt, die wässrige Phase drei bis vier Mal mit Ethylacetat gewaschen, einrotiert und anschließend gefriergetrocknet (siehe 3.2.5.2). Die Reinheit wurde mittels NMR erfasst (siehe 3.2.2.9): ^1H NMR (300 MHz, D₂O) δ 3.72 (t, J = 6.1 Hz, 1H, H-1), 3.18 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H-5), 1.88 (s, 3H, Ac-H), 1.74 (m, 2H, H-2), 1.54 – 1.22 (m, 4H, H-3, H-4).

Wie in Abbildung 47 dargestellt, handelt es sich ausschließlich um ϵ -N-Lys(Ac)-OH. Im Vergleich mit den Daten von Dose *et al.* (2011) konnten alle Signale im ^1H -NMR-Spektrum identifiziert und zugeordnet werden:

- 1: ^1H NMR (300 MHz, D₂O) δ 3,72 (t, J = 6,1 Hz, 1H, 1)
- 2: 3,18 (t, J = 6,8 Hz, 2H)

- 3: 1,97 (s, 3H, Ac), 1,90 – 1,80 (m, 2H)
- 4: 1,61 – 1,48 (m, 2H)
- 5: 1,47 – 1,31 (m, 2H)

4.3.3.2 Ortsspezifische Mutagenese der Histone H2A, H2B sowie H3 zur Einführung des Acetyl-Lysin-Motivs an spezifischen Stellen

Die Plasmide pBKanAcKRS3, pCDF PyIT H2A, pCDF PyIT H2B sowie pCDF PyIT H3 wurden in den *E.coli*-Stamm XL1-blue transformiert (siehe 3.2.7.8), die DNA mittels Plasmidpräparation gewonnen (siehe 3.2.7.9) und in einer ortsspezifischen Mutagenese eingesetzt (siehe 3.2.7.2). Hierzu wurden mittels spezifischer Primer folgende Positionen zu TAG geändert:

- H2A: K6, K10
- H2B: K13, K17, K22, K29, K110
- H3: K5, K10, K15, K19, K24, K37, K57, K80

Die Positionsbezeichnung beschreibt die jeweilige Position der Mono-Acetylierung.

Das in PCR-Produkt wurde im Anschluss an einen DPNI-Verdau in *E.coli* XL1-blue-Zellen transformiert und die DNA isoliert (siehe 3.2.7.3 und 3.2.7.8) und nach der Sequenzierung in einen mit pBKan AcKRSA3 transformierten *E.coli* BL21-Stamm transformiert (siehe 3.2.7.9 und 3.2.7.13).

4.3.3.3 Produktion der Histone von H2A, H2B, H3 sowie den mono-acetylierten Varianten

Zunächst wurde eine Transformation (siehe 3.2.7.8) des Vektors pBKanAcKRS3, welcher für die tRNA_{CUA} sowie die ϵ -N-Acetyllysyl-tRNA-Synthetase codiert, in *E.coli* BL21 DE3 durchgeführt und diese Zellen nach einer Selektion erneut chemisch kompetent gemacht (siehe 3.2.7.12). Anschließend wurden die jeweiligen Plasmide zur Expression der Histonvarianten eingebracht (siehe 3.2.6.1 und 3.2.6.1.1).

4.3.3.4 Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens der Histon-Proteine

Die Aufreinigung der denaturierten Histone erfolgte im IMAC-Verfahren (siehe 3.2.6.1.2) durch die Veränderung des pH-Wertes. Alle Fraktionen wurden auf ihren OD₆₀₀-Gehalt (siehe 3.2.2.2.2) untersucht und die Spitzenfraktionen vereinigt in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) gefolgt von einer Coomassiefärbung (siehe 3.2.2.3.2) bestimmt. Darüber hinaus wurden in einer Western Blot-Analyse die Antikörper anti-HisTag sowie anti-AcK eingesetzt (siehe 3.2.2.4). Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Abbildung 48 dargestellt.

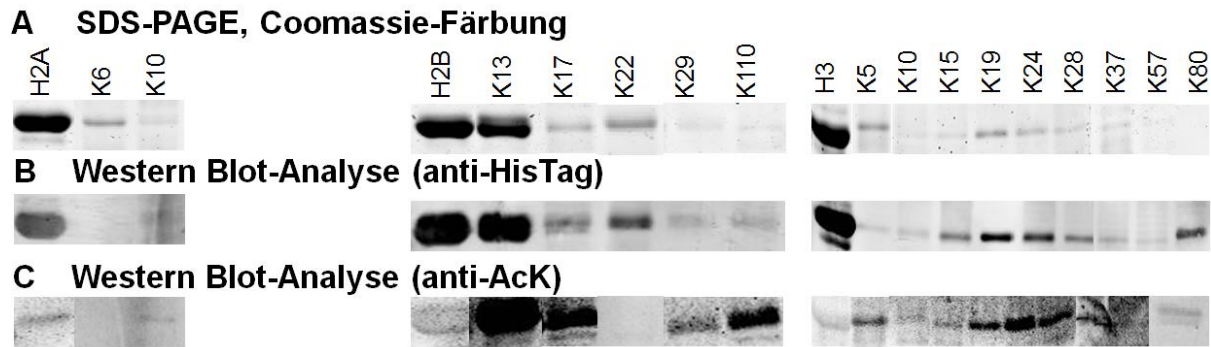


Abbildung 48: Nachweis der Produktionseffizienz verschiedener Histonvarianten.

Unter Verwendung der Methode nach Neumann *et al.* 2008 wurden die Varianten der Histone H2A, H2B sowie H3 in *E.coli* BL21 produziert (siehe 3.2.6.1.1), mittels pH-Shift im IMAC-Verfahren aufgereinigt (siehe 3.2.6.1.2) und in einer 12,5%-igen SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1) mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.3.2) nachgewiesen (A). Der spezifische Histon-Nachweis erfolgte im Anschluss an eine 12,5%-igen SDS-PAGE immunologisch in der Western Blot-Analyse (siehe 3.2.2.4 unter Verwendung der Antikörper anti-HisTag (B) sowie anti-AcK (C)).

Die Histone H2A, H2B sowie H3 konnten durch die Coomassie-Färbung dargestellt werden (siehe Abbildung 48A). Die mono-acetylierten Varianten konnten ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die Bandenintensität und damit einhergehend die Proteinmenge divergent war. Der Einsatz des anti-HisTag-Antikörpers in der Western Blot-Analyse bestätigte dieses Ergebnis (siehe Abbildung 48B), wobei eine Korrelation der Bandenintensität nicht gegeben war.

Die Acetylierung konnte unter Verwendung des anti-AcK-Antikörpers bestätigt werden (siehe Abbildung 48C). Die Spezifität wurde insbesondere durch den fehlenden Nachweis der nicht-acetylierten Histonvarianten gezeigt.

Auf Grund der mangelnden Reinheit der Proben war die Proteinbestimmung (siehe 3.2.2.2.1, Daten nicht gezeigt) nicht aussagekräftig (Daten nicht gezeigt).

4.3.3.4.1 Adaption des Aufreinigungsverfahrens zur Erhöhung der Probenreinheit

Die Aufreinigung des HDAC8-Proteins mittels Imidazolgradienten resultierte im Vergleich zum pH-Shift (siehe 3.2.6.1.2) in einem deutlich höheren Reinheitsgehalt. Aus diesem Grund wurde

das Verfahren auf die Histonaufreinigung exemplarisch für H2AK17 adaptiert (siehe Abbildung 49).

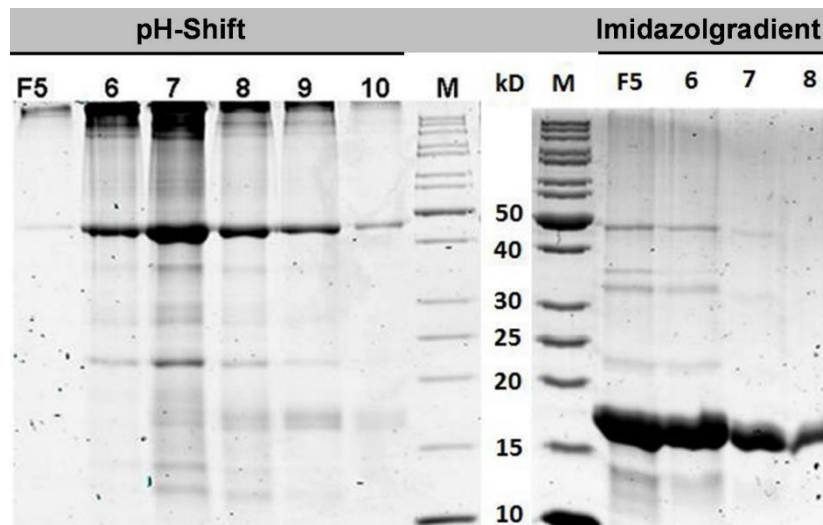


Abbildung 49: Adaption des Aufreinigungsverfahrens des Histons H2BK17

Unter Verwendung der Methode nach Neumann *et al.* (2008) wurden das Histon H2BK17 produziert (siehe 3.2.6.1.1, mittels Imidazolgradienten von 0 bis 1 M (siehe 3.2.6.1.2) aufgereinigt und die Spitzenfraktionen (A_{280} -Messung) in einer 12,5%-igen SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.1 mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.3.2) nachgewiesen (rechts). Im Vergleich hierzu sind die Ergebnisse aus 4.3.3.4 nach Aufreinigung mittels pH-Shift dargestellt (links).

Die Adaption des Aufreinigungsverfahrens wurde exemplarisch für das Histon H2BK17 durchgeführt, da sich hier im Vorfeld sowohl eine niedrige Proteinmenge als auch –reinheit zeigte. Zwischen 15 und 20 kDa konnte in allen Fraktionen eine Bande mit höherer Intensität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 49). Sowohl oberhalb als auch unterhalb waren weitere Proteine nachweisbar. Die Gesamtmenge war jedoch im Vergleich zum vorangegangenen Experiment verringert.

4.3.3.5 Histone als Substrate der HDAC8

4.3.3.5.1 Kompetitionstest zum Nachweis einer Bindung zwischen HDAC8 und den Histonvarianten

Zum Nachweis einer HDAC8-Bindung an die Histone sollte der Zweischnitt-Aktivitätstest eingesetzt werden (siehe 3.2.4.4, siehe Abbildung 50).

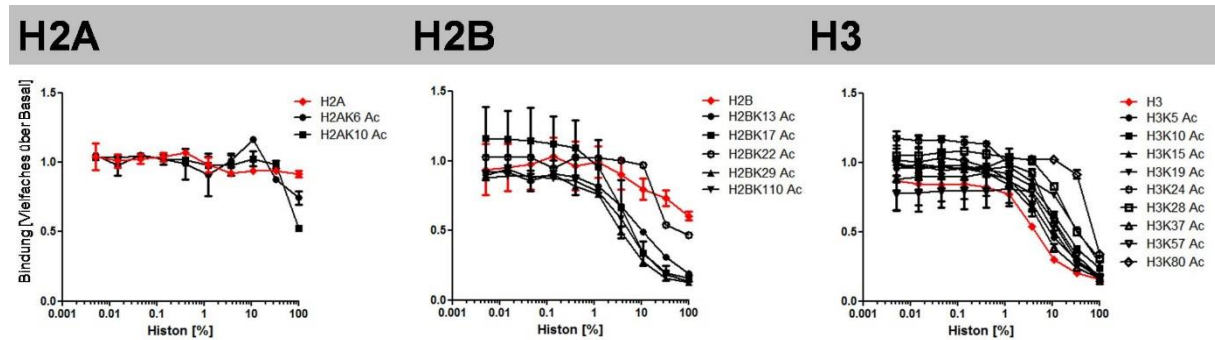


Abbildung 50: Wettbewerbtest zum Nachweis einer HDAC8-Bindung an Histone.

Die Histone H2A, H2B, H3 sowie deren mono-acetylierte Varianten wurden im Wettbewerbtest (siehe 3.2.4.4) mit dem rekombinant exprimiertem, aufgereinigtem HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2) inkubiert und die Bindung indirekt durch die Verdrängung des künstlichen Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC (30 μ M) erfasst ($\lambda_{EM} = 340$ nm/ $\lambda_{EX} = 460$ nm). Die Werte sind Mittelwerte (mean) \pm SEM, n=2 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das abgebildete Symbol).

Die Bindung einer Histonvariante sollte in der Verdrängung des künstlichen Substrates Boc-Lys(TFA)-AMC resultieren. Da hierdurch kein freies AMC vorliegt entspräche das Messsignal der Negativkontrolle. Da die Histonproteine nicht rein vorlagen, war keine Proteinkonzentrationsbestimmung möglich, sodass jeweils 105 μ L der Lösung eingesetzt wurden. Die Werte wurden als Prozente angegeben, wobei der Startpunkt der Verdünnungsreihe auf 100% gesetzt wurde.

Das nicht-acetylierte H2A-Protein sowie beide mono-acetylierte H2A-Histone zeigten keine Verdrängung des künstlichen Substrates (siehe Abbildung 50). Für H2B hingegen, konnte eine schwache und für H3 eine stärkere Bindung an das HDAC8-Protein nachgewiesen werden. Bis auf H2BK22 zeigten alle anderen mono-acetylierten Varianten ein ähnliches Bindeverhalten. Auf Grund der unterschiedlichen Konzentration der Histone in Lösung liegt die Vermutung einer HDAC8-Substratspezifität gegenüber den einzelnen Varianten nahe. Da die Proben jedoch nicht rein waren, konnte die Konzentration der Proben nicht berücksichtigt werden, sodass spezifische Bindungsdaten nicht erhoben werden konnten.

4.3.3.5.2 LC/MS zum Nachweis der Acetylierung der Histone

In Zusammenarbeit mit Daniel Petras (Instituts für Chemie, Technische Universität, Berlin) wurde der Nachweis der Histonacetylierung durchgeführt (siehe 3.2.5.1). Hierzu wurde eine Flüssigchromatographie mit einer Massenspektrometrie gekoppelt (LC/MS). Dies diente der Separation der beiden Varianten acetyliertes bzw. nicht-acetyliertes Histon. Die Histon-Varianten wurden aus 4.3.3.3 im Überschuss mit rekombinant exprimiertem, aufgereinigtem HDAC8 inkubiert und anschließend gefriergetrocknet. Die Messung und Auswertung erfolgte durch Daniel Petras.

Das Histon H2A wurde mit einer Masse von 16283 Da nachgewiesen. Die beiden potentiell mono-acetylierten Varianten H2AK6 sowie H2AK10 wiesen ebenfalls diese Masse auf. Das

Histon H3 konnte ausschließlich mit einer Masse von 17555 Da detektiert werden. Für die entsprechenden acetylierten Varianten erfolgte kein Nachweis.

Der Nachweis der H2B-Varianten ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: LC/MS-Nachweis des Histons H2B und den mono-acetylierten Varianten

Das Histon H2B und die mono-acetylierten Varianten H2BK13, H2BK17, H2BK22, H2BK29 sowie H2BK110 aus 4.3.3.3 wurden vor (nativ) und nach der Inkubation mit rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem HDAC8-Protein (siehe 3.2.6.2) mittels LC/MS durch Daniel Petras (Chemisches Institut, Technische Universität, Berlin) bestimmt (siehe 3.2.5.1). Wt: Wildtyp. Die Deacetylierte Variante ist in fett hervorgehoben.

Histon	Masse (nativ)	Masse (nach HDAC8-Inkubation)
H2B Wt	15826,5	15826,5
H2BK13	15724,5 15811,5 15868,5	15724,5 15811,5 15868,5
H2BK17	15725,5 15812,5 15868,6	15724,5 15811,5 15868,5
H2BK22	15826,6 15868,5	15826,6 15868,5
H2K29	15826,5 15868,5	15826,5 15868,5
H2BK110	Nicht detektiert	

Das native H2B-Protein besitzt eine berechnete Masse von 15958 Da. Damit weicht die bestimmte Masse von 15826,5 um 131,5 Da ab (siehe Tabelle 2). Dies entspricht der Masse eines Methionins.

Die Acetylfunktion besitzt eine Masse von 42 kDa. Die acetylierte Variante besitzt demnach eine Masse von 15868 Da. Die acetylierte Variante konnte in den Proben H2BK13, H2BK17, H2BK22 sowie H2BK29 im nativen Zustand nachgewiesen werden. Nach einer Inkubation mit dem HDAC8-Protein war das Histon ebenfalls in den genannten Proben nachweisbar.

In den Proben H2BK22 sowie H2BK29 wurde darüber hinaus ein zweites Protein mit einer Masse von ca. 15827 Da bestimmt. Die Massendifferenz entspricht der Acetylierung. In Abbildung 51 sind die entsprechenden Chromatogramme dargestellt.

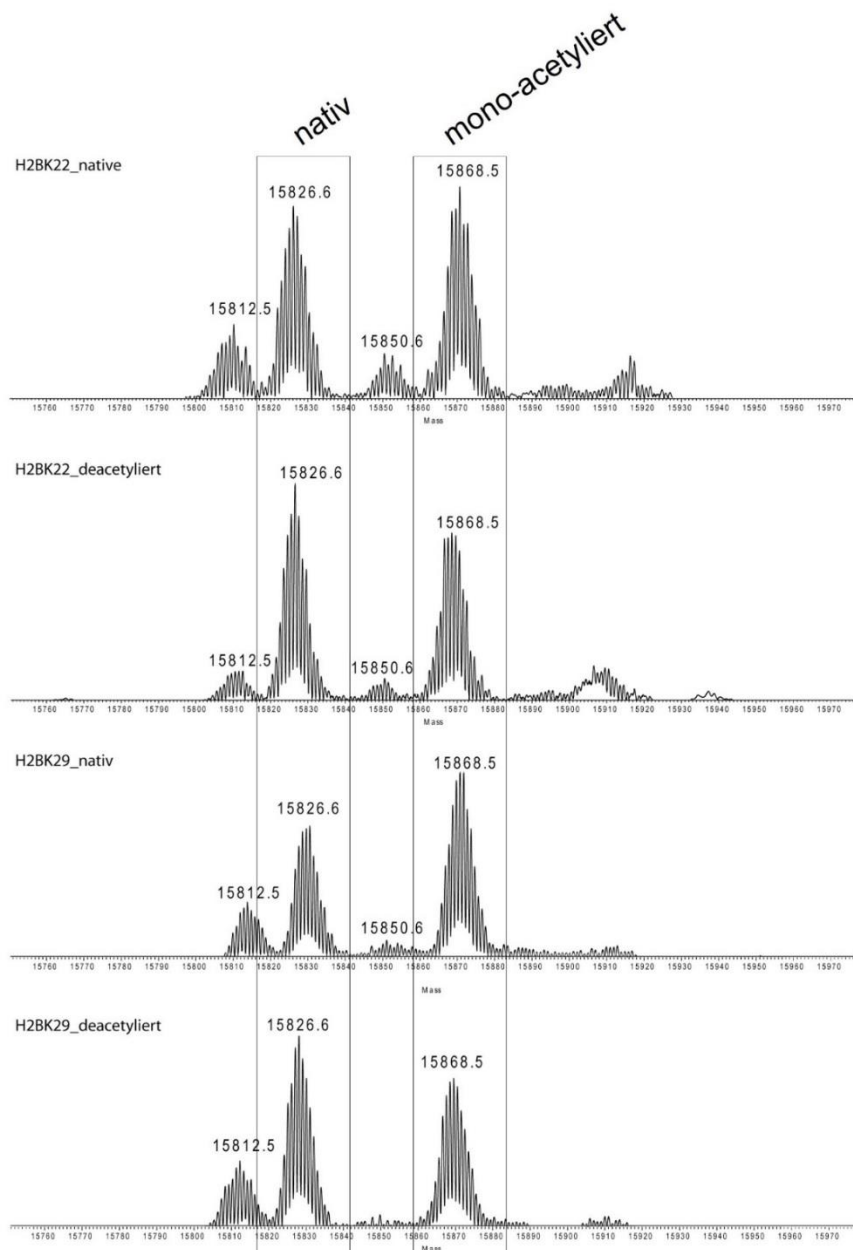


Abbildung 51: LC/MS-Messung zum Nachweis der Mono-Acetylierung der Histonen H2BK22 sowie H2BK29.

H2BK22 und H2BK29 wurden in *E.coli* BI21 exprimiert (siehe 3.2.6.1.1), über das IMAC-Verfahren (pH-Shift) aufgereinigt (siehe 3.2.6.1.2) und anschließend mit rekombinant hergestelltem HDAC8 (siehe 3.2.6.2) in einem Verhältnis von 1:1 versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT in HDAC8-Puffer. Anschließend wurden die lyophilisierten Proben (siehe 3.2.2.8) auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL in 5% (v/v) Acetonitril (ACN) mit 1% (v/v) Ameisensäure (HFO) verdünnt und für 10 min bei 12000xg zentrifugiert. Die LC-ESI-HR-MS-Messungen (siehe 3.2.5.1) wurden durch Daniel Petras (Chemisches Institut, TU Berlin) an einem Orbitrap XL Massenspektrometer sowie einem Agilent HPLC-System durchgeführt. Zur RP-Separation fand eine Suppelco Discovery 300 Å C18 Säule (2 x 15 mm, 3 µm) mit H₂O und ACN mit 0,1% (v/v) HFO als mobile Phase Einsatz. Der lineare Gradient von 5 – 70% (v/v) ACN über 20 min, gefolgt von einer 5-minütigen Ausschwemmphase mit 70% (v/v) ACN wurde bei einer Flussrate von 0,3 mL/min durchgeführt. Das Top down MS/MS-Spektrum wurde direkt im IDA-Modus (Top1) unter Verwendung von CID (CE 35, 30msec Aktivierung) durchgeführt und der Survey-Scan wurde bei R= 30 000 und 400 m/z und einer maximalen Füllzeit von 250 ms. Der Produktionscan erfolgte mit R= 30 000 und 400 m/z mit einer maximal Füllzeit von 250 ms. Die Massenspektren wurden unter Verwendung von Magtran und die MS/MS-Spektren manuell erhoben.

4.4 Identifikation von HDAC8-Inhibitoren

4.4.1 Screen der LOPAC-Bibliothek gegen das HDAC8-Protein

Das HDAC8-Protein wurde rekombinant als Fusionsprotein mit einem His-Tag produziert und über eine Ni-Sepharose-Säule nach dem IMAC-Verfahren aufgereinigt (siehe 3.2.6.2). Die Fraktionen mit einer hohen Reinheit und Aktivität wurden vereinigt und im Aktivitätstest (siehe 3.2.4.1) die einzusetzende Versuchskonzentration ermittelt, wobei ein Wert von ca. 3-fach über Basal Verwendung fand. Der IC_{50} -Wert des unselektiven Inhibitors SAHA lag bei 382,9 nM und des selektiven Inhibitors PCI-34051 bei 44,0 μ M. Hierfür wurde das Substrat Boc-Lys(TFA)-AMC eingesetzt, da vorangegangene Untersuchungen Boc-Lys(Ac)-AMC als kein HDAC8-Substrat nachwiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Kontrollplatte mit 48 Positiv- und 48 Negativ-Kontrollen ergab bei einer HDAC8-Konzentration von 80 nM und einer Substratkonzentration von 30 μ M einen Z' -Wert von 0,794. Unter den entsprechenden Bedingungen wurde der Screen der LOPAC-Bibliothek durchgeführt (siehe 3.2.4.3). Die Aktivitäten nach Substanz-Inkubation wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Platte normiert und gegen die Nummer der Kavität aufgetragen (siehe Abbildung 52).

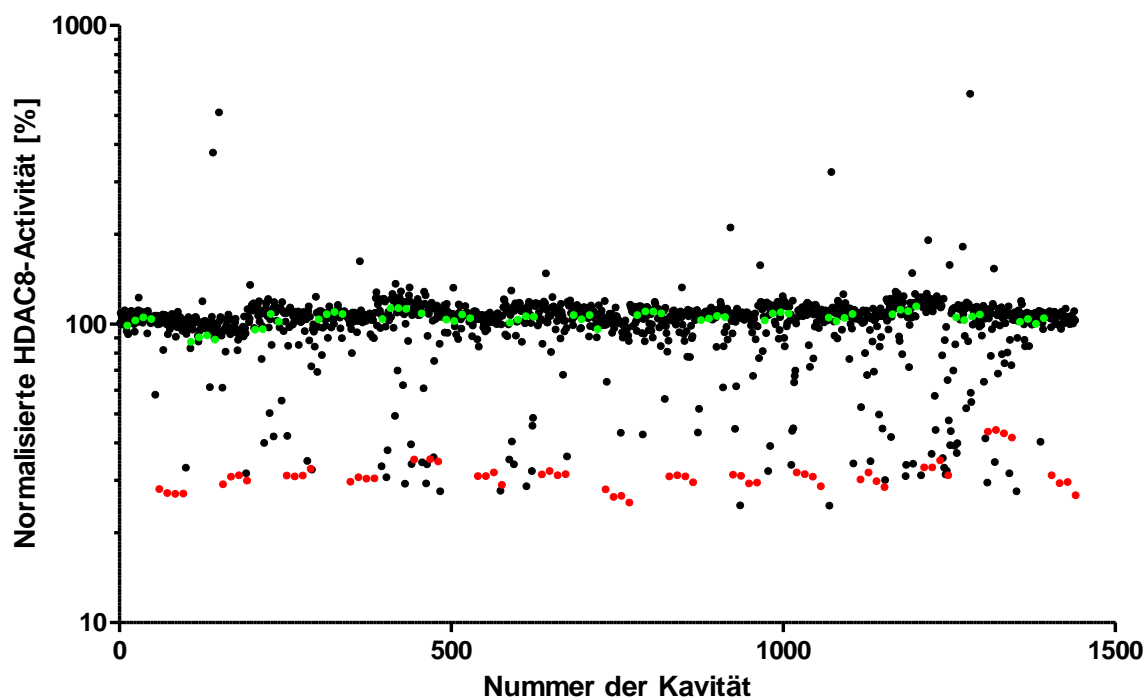


Abbildung 52: Screen der LOPAC-Bibliothek gegen das HDAC8-Protein.

Das HDAC8-Protein wurde rekombinant in *E.coli* XL1 Blue-Zellen exprimiert und über die IMAC-Methode aufgereinigt (siehe 3.2.6). Eine Proteinkonzentration von 80 nM wurde bei einer Substratkonzentration an Boc-Lys(TFA)-AMC von 30 μ M und einer InhibitorKonzentration von 12,5 μ M im Aktivitätstest eingesetzt ($\lambda_{EM} = 340$ nm/ $\lambda_{EX} = 460$ nm). Pro Platte wurden jeweils vier Positivkontrollen (Protein ohne Inhibitor, grün) und vier Negativkontrollen (ohne Protein und ohne Inhibitor, rot) mitgeführt (siehe 3.2.4.3). Die Normierung erfolgte auf den Mittelwert der Platte. n=1

Der Z' -Werte der Platten betrug im Mittel $0,842 \pm 0,054$. Bezogen auf den Mittelwert der jeweiligen Platte lag die Aktivität der Positivkontrolle mit 105% 3,3-fach über der Negativkontrolle mit 31%.

Eine Hitschwelle von 50% des Mittelwertes der Platte ergab von 1379 getesteten Substanzen 61 positive, was 4,4% entspricht.

Zur Wiederbestätigung wurden diese mit einer Startkonzentration von 35 μM in einer 1:3-Verdünnungsreihe mit fünf Messpunkten untersucht. Alle Substanzen zeigten in der höchsten Konzentration eine Inhibierung [Daten nicht gezeigt].

4.4.2 Nachweis von Fluoreszenz-löschenden Substanzen

Zum Ausschluss von Substanzen, die die Fluoreszenz von AMC löschen und folglich als falsch-positiv anzusehen sind, wurde der Einfluss der Substanzen mit einer Konzentration von 35 μM in einer Doppelbestimmung gegen Boc-Lys-AMC mit einer Konzentration von 3,12 μM untersucht (siehe 3.2.4.2). Als Substanzen mit erniedrigter Fluoreszenz wurden C-126, E-100, G 3416, H9003, B8433, L8533, N4148, N5023, P6503, T4568, T4693 sowie U-120 getestet.

4.4.3 Isoformselektivität der Substanzen

Ziel des Screens war neben der Identifikation von potenten Substanzen auch die HDAC8-Selektivität im Vergleich zu anderen HDAC-Isoformen nachzuweisen. Hierzu wurden die normierten Daten des Screens der LOPAC-Bibliothek gegen das HDAC8-Protein (siehe 4.4.1) mit den Daten des vorangegangenen Screens gegen HDAH [Haus *et al.*, 2011] aufgetragen (siehe Abbildung 53).

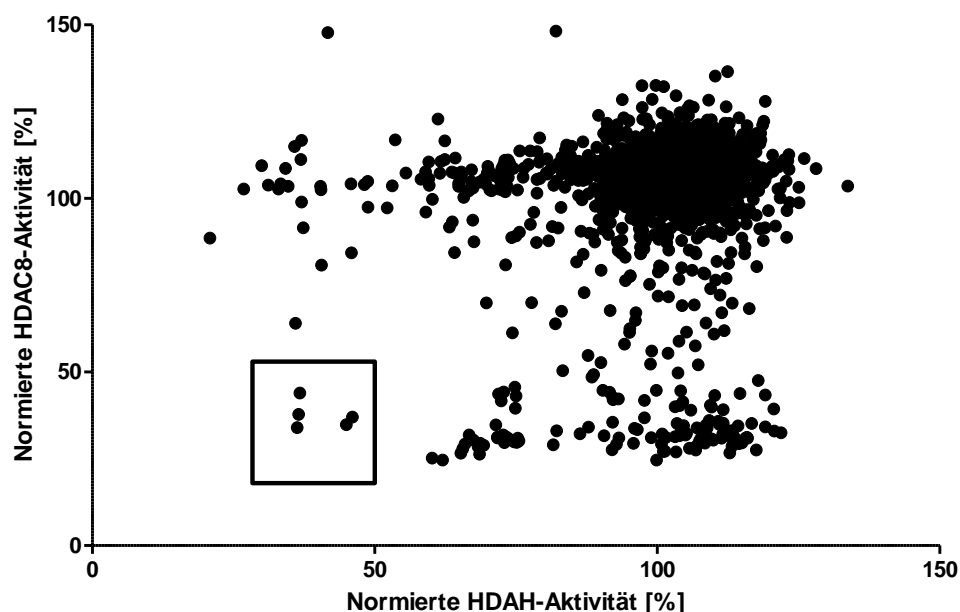


Abbildung 53: Vergleich des Screens der LOPAC-Bibliothek gegen die Proteine HDAC8 und HDAH.

HDAC8 und HDAH wurde rekombinant in *E.coli* XL1 Blue-Zellen exprimiert (siehe 3.2.6.2) und über die IMAC-Methode aufgereinigt. Für das HDAC8-Protein wurde eine Proteinkonzentration von 80 nM bei einer Substratkonzentration an Boc-Lys(TFA)-AMC von 30 μ M und einer Inhibitorkonzentration von 31 μ M (HDAH bzw. 12,5 μ M (HDAC8) im Aktivitätstest eingesetzt (siehe 3.2.4.3; λ_{EM} = 340 nm/ λ_{EX} = 460 nm). Die Konzentration von HDAH betrug ca. 2 μ M bei einer Substratkonzentration an Boc-Lys(Ac)-AMC von 10 μ M. Die Normierung erfolgte auf den Mittelwert der Platte.

Eine Korrelation der Daten beider Proteine unterhalb der Hitschwelle des HDAC8-Screens ergab eine Übereinstimmung der Substanzen P4509, C-126, D-002, C 8221 und T4443, wobei C-126 als Fluoreszenz-löschenden Substanz identifiziert wurde (siehe Abbildung 53).

Darüber hinaus wurden die Substanzen mit einer Konzentration von 35 μ M als Doppelbestimmung gegen HDAC4 im Aktivitätstest (siehe 3.2.4.2) unter Verwendung des Substrats Boc-Lys(TFA)-AMC in einer Konzentration von 40 μ M untersucht (siehe Abbildung 54).

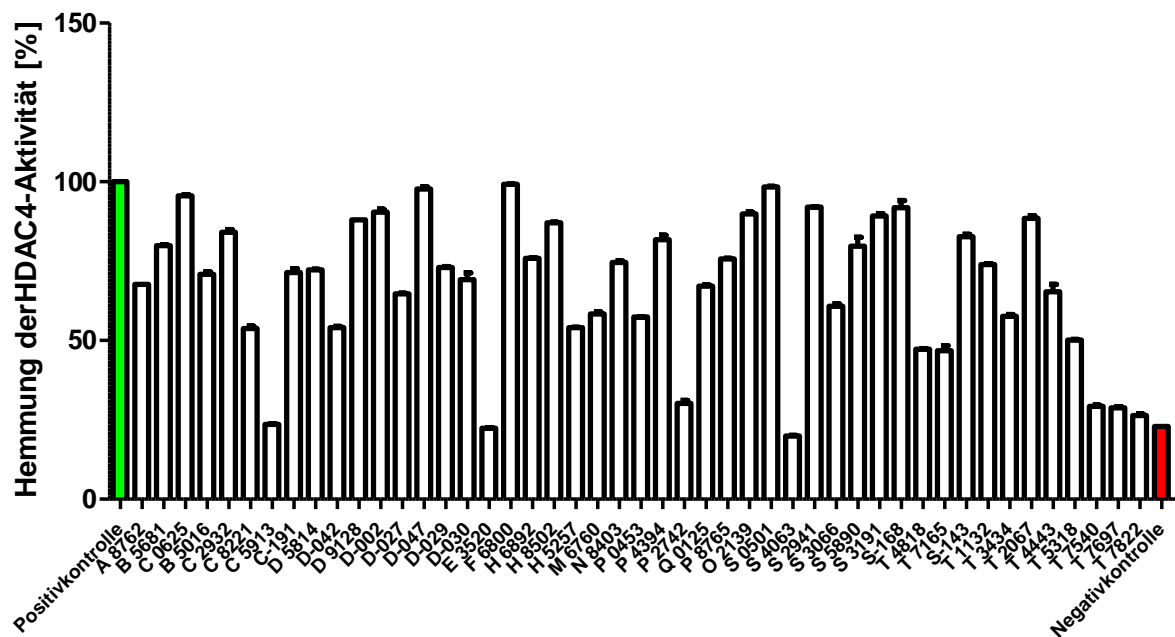


Abbildung 54: Untersuchung von Substanzen der LOPAC-Bibliothek gegen HDAC4

HDAC4 wurde rekombinant in *E.coli* BL21-Zellen von Jan Brod (Arbeitsgruppe Prof. Meyer-Almes, Hochschule Darmstadt,) exprimiert und über die IMAC-Methode aufgereinigt. HDAC4 wurde bei einer Substratkonzentration an Boc-Lys(TFA)-AMC von 40 μM und einer Inhibitorkonzentration von 35 μM im Aktivitätstest (siehe 3.2.4.2) eingesetzt ($\lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{EX}} = 460 \text{ nm}$). Die Normierung erfolgte auf die Aktivität der Negativkontrolle. Die Werte sind Mittelwerte (mean) \pm SEM, $n=2$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als das verwendete Symbol).

Die neun Substanzen C 5913, E 3520, P 2742, S 4063, T 4818, T 7165, T 7540, T 7697 und T 7822 wiesen eine Inhibierung von mindestens 50% der Enzymaktivität auf (siehe Abbildung 54).

Im Folgenden wurde die Selektivität der Substanz P2742 weiter betrachtet. In Abbildung 55 ist die Isoformselektivität der Substanz P2742 dargestellt.

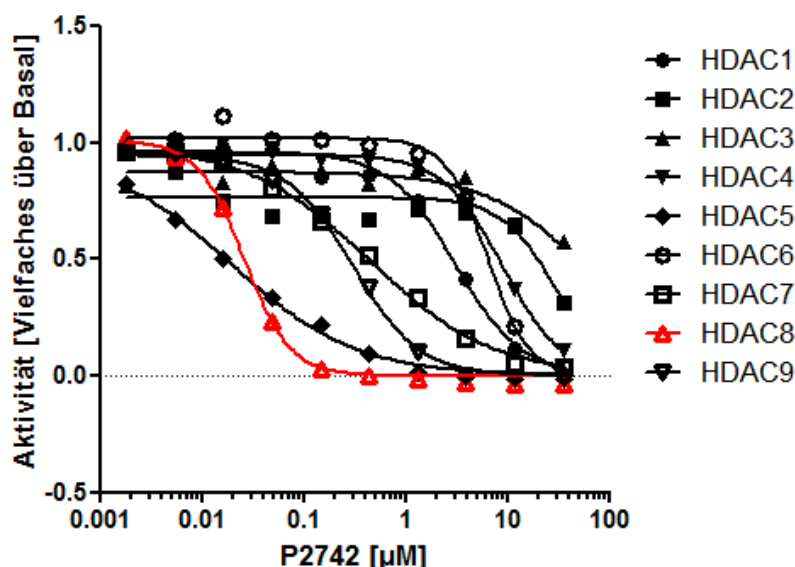


Abbildung 55: HDAC-Isoformselektivität der Substanz P 2742.

Eine Proteinkonzentration von 7,4 nM für HDAC1, 10 nM für HDAC2, 10,3 nM für HDAC3, 199,4 pM für HDAC4, 2,14 nM für HDAC5, 3,13 nM für HDAC6, 147,5 pM für HDAC7, 200 pM für HDAC8 sowie 5,4 nM für HDAC9 wurde bei einer Substratkonzentration an Boc-Lys(TFA)-AMC (HDAC4, 5, 7, 8 und 9) bzw. Boc-Lys(Ac)-AMC von 40 µM im Aktivitätstest eingesetzt ($\lambda_{EM} = 340 \text{ nm}$ / $\lambda_{EX} = 460 \text{ nm}$). Ausgehend von einer Inhibitorstartkonzentration von 35 µM wurde eine 1:3-Verdünnung mit zehn Messpunkten durchgeführt (siehe 3.2.4.2). Die Normierung erfolgte auf die Aktivität der Negativkontrolle. Das Experiment wurde im Rahmen seiner Arbeit von Christian Meyners (Arbeitsgruppe Prof. Meyer-Almes, Hochschule Darmstadt) durchgeführt.

Für die Substanz P 2742 ergaben sich folgende IC_{50} -Werte: HDAC1 3,05 µM, HDAC2 28,82 µM, HDAC3 66,87 µM, HDAC4 8,78 µM, HDAC5 0,019 µM, HDAC6 6,30 µM, HDAC7 0,44 µM, HDAC8 0,03 µM und HDAC9 0,30 µM.

4.4.4 IC_{50} -Wert-Bestimmung von Substanzen gegen das HDAC8-Protein

Als Ausschlusskriterien zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Substanzen gegen das HDAC8-Protein wurden das Quenchverhalten, die Inhibierung der HDAH, die Inhibierung der HDAC4 und die Limitierung der Verfügbarkeit gewählt. Der IC_{50} -Wert der verbleibenden Substanzen wurde in einer 10-Punkt-Messung mit einer Startkonzentration von 35 µM mit rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem HDAC8-Protein bestimmt (siehe 3.2.4.2; siehe Tabelle 3).

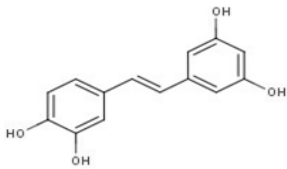
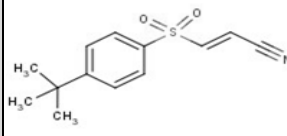
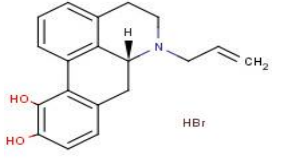
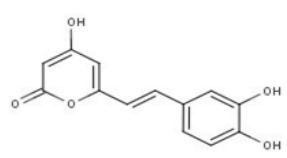
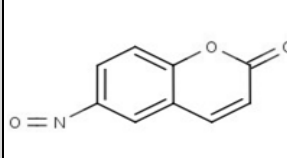
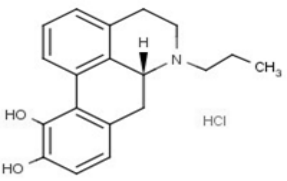
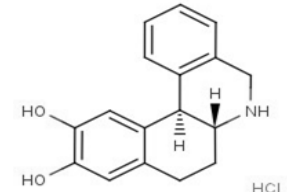
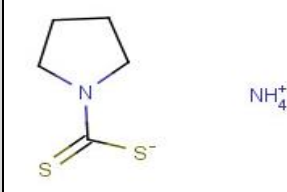
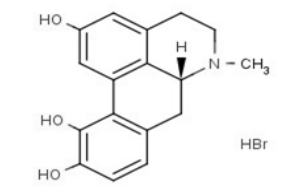
Tabelle 3: IC₅₀-Werte von Substanzen der LOPAC-Bibliothek gegen das HDAC8-Protein

Cat-Nummer	Bezeichnung	IC ₅₀ -Wert [µM]
P 0453	Piceatannol	0,24±0,01
B 5681	Bay 11-7085	0,46±0,05
D-042	R(-)-N-Allylnorapomorphinhydrobromide	0,46±0,05
H 5257	Hispidin	0,51±0,03
N 8403	6-Nitroso-1,2-benzopyron	0,53±0,09
D-027	R(-)-Propylnor-apomorphinhydrochloride	0,56±0,08
D 5814	Dihydropyridinehydrochloride	0,66±0,04
P 8765	Ammoniumpyrrolidindithiocarbamat	0,81±0,14
D-029	R(-)-2,10,11-Trihydroxyapomorphinhydrobromid	0,89±0,06
D-030	R(-)-2,10,11-Trihydroxy-N-propylnorapomorphinhydrobromid	1,12±0,07
S 3066	SKF 89626	1,29±0,03
D-047	(±)-SKF-38393-hydrochlorid	1,57±0,12
A 8762	N-Acetyldopaminmonohydrat	1,60±0,07
C-191	Capsazepin	2,34±1,50
D 9128	3,4-Dihydroxyphenylacetatsäure	2,71±0,31
B 5016	Bepiridilhydrochloride	3,01±0,11
S-143	(±)-6-Chloro-PB-hydrobromid	3,43±0,25
C 0625	Kaffeesäure	3,47±0,48
M 6760	Myricetin	6,06±6,84
S 5890	Sanguinarinchloride	7,00±0,37
P 4394	Cisplatin	7,40±3,88
H 8502	Dopaminhydrochlorid	8,03±0,32
S 2941	SKF 75670-hydrobromid	11,23±0,31
C 2932	Chelerythrin-chloride	11,70±257,70
T 7665	Tyrphostin 51	14,59±3,28
H 6892	1-(4-Hydroxybenzyl)imidazole-2-thiol	22,74±14,16
T 3434	Tyrphostin AG 490	27,41±38,98
T 5318	Tyrphostin AG 808	30,02±23,06
Q 0125	Quercetin-dihydrate	>35
O 2139	N-Oleoyldopamin	>35
S 0501	Natriumnitro-prussidihydrat	>35
S 3191	SKF 83565-hydrobromid	>35
T 1132	Tetraethyl-thiuramdisulfide	>35
T 2067	Tyrphostin AG 879	>35

In Tabelle 4 sind die Strukturen der Substanzen mit einem IC₅₀-Wert <1 µM dargestellt.

Tabelle 4: Screening-Kampagne der LOPAC-Bibliothek gegen HDAC8.

Dargestellt sind Substanzen mit einem IC₅₀-Wert < 1 µM (Zunahme der inhibitorischen Wirkung von links nach rechts sowie von oben nach unten).

P 0453		B 5681		D-042	 HBr
H 5257		N 8403		D-027	 HCl
D 5814	 HCl	P 8765	 NH ₄ ⁺	D-029	 HBr

5 Diskussion

Das HDAC8-Protein als Vertreter der Klasse I HDACs wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht und weist ein weitgefächertes Interaktionsprofil [Wolfson *et al.*, 2012] mit einem widersprüchlich beschriebenen intrazellulären Vorkommen auf [Hu *et al.*, 2000; van den Wyngaert *et al.*, 2000; Waltregny *et al.*, 2004]. Die tatsächliche Physiologie insbesondere der Deacetylase-Funktion konnte jedoch ausschließlich im Zusammenhang mit dem Cornelia de Lange-Syndrom gezeigt werden [Deardorff, 2012]. Aus diesem Grund stand in dieser Arbeit die Identifikation eines geeigneten Zellmodells im Fokus, mit dessen Hilfe der Nachweis von Interaktionspartnern möglich sein sollte. Zunächst wurden klassische Methoden wie die nativen PAGE und eine Immunpräzipitation gewählt. Auf Grund des geringen intrazellulären HDAC8-Vorkommens wurden darüber hinaus zwei vollkommen neue Ansätze mit der Substanz-basierten Präzipitation von Proteinoberflächen-Interaktionspartnern sowie einer erweiterten Präzipitation mit deutlich höherer HDAC8-Proteinmenge verfolgt. Des Weiteren diente in der Zelllinie Hek293 die Kombination der Methoden fraktionierte Zelllyse, Immunfärbung und transiente Expression von Fusionsproteinen mit Fluorophoren einer umfassenden Lokalisationserfassung. Zur abschließenden Klärung wurde der photo-schaltbare mEos2-Fluorophor eingesetzt, mit dessen Hilfe die Erfassung des HDAC8-Transports über die Kernmembran möglich war. Dies sollte zum besseren Verständnis der physiologischen Rolle des HDAC8-Proteins beitragen. Auch die Erfassung eines Interaktionsprofils mit kleinen Molekülen diente diesem Ziel.

5.1 Die intrazelluläre Lokalisation des HDAC8-Proteins

Die intrazelluläre Lokalisation kann über die physiologische Rolle eines Proteins Aufschluss geben. So werden die Proteine verschiedener Kompartimente zunächst nahezu ausschließlich im Cytoplasma synthetisiert und anschließend an ihren Bestimmungsort transportiert. Für die endgültige Lokalisation eines Proteins sind u.a. bestimmte Aminosäureabfolgen wie die NLS (NLS, Nuclear Localization Sequence) verantwortlich [Lange *et al.*, 2006]. Die Arbeitsgruppe um Hu hat im Jahr 2000 im Rahmen der ersten Klonierung und Charakterisierung des HDAC8-Proteins die putative NLS „RLRRK“ beschrieben. Sie wies mit hauptsächlich basischen Aminosäuren eine Übereinstimmung mit dem NLS-Motiv nach Makkerh, Dingwall und Laskey (1996) auf, jedoch wich sie von der Konsensussequenz K-K/R-X-K/R [Chelsky, Ralph und Jonak, 1989] ab. Zur Klärung fanden die beiden Programme NucPred [Brameier, Krings und MacCallum, 2007] sowie PSORT [Nakai und Horton, 1999] Verwendung, welche eine cytoplasmatische Lokalisation für das HDAC8-Protein mit höherer Wahrscheinlichkeit vorhersagten. Der Abgleich erfolgte hier mit bekannten NLS-Sequenzen. Dies deutete darauf hin, dass es sich lediglich um eine putative NLS mit keiner physiologischen Bedeutung handeln

könnte. Eine BLAST-Suche nach der beschriebenen Sequenz resultierte hingegen in ca. 80 Treffern mit Proteinen rein nukleärer, jedoch auch rein cytoplasmatischer Lokalisation. Die Mutation der NLS-Sequenz könnte die tatsächliche Funktionalität bestätigen.

Die Betrachtung der putativen NLS-Sequenz konnte nicht zur Klärung der HDAC8-Lokalisation beitragen. Aus diesem Grund wurde in einer umfassenden Lokalisationsuntersuchung zunächst eine fraktionierte Zellyse verschiedener, immortalierter Zelllinien durchgeführt. In Hek293-Zellen war die HDAC8-Menge im Cytoplasma deutlich höher als im Kern, wobei in letzterem Kompartiment eine weitere signifikante Bande bei ca. 72 kDA nachweisbar war. Rekombinant exprimiertes HDAC8-Protein lag in Lösung aktiv als Monomer vor, in 14 von 21 HDAC8-Kristallisationsuntersuchungen resultierte die Kristallisation jedoch in einer Protein-Dimerisierung [Dowling *et al.*, 2008; Dowling *et al.*, 2010; Vannini *et al.*, 2004; Vannini *et al.*, 2004; Somoza *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2011; Cole *et al.*, 2011]. Auch für HDAC1 und 2, ebenfalls Vertreter der Klasse I HDACs, wurde die Möglichkeit zur Dimerisierung bestätigt [Delcuve, Khan und Davie, 2012].

Die Lokalisationsuntersuchungen der Arbeitsgruppen um Hu *et al.* (2000) sowie Waltregny *et al.* (2004) zeigten ebenfalls eine divergente HDAC8-Lokalisation. So war hier das HDAC8-Protein in SW-620-Zellen (Darmzellen) ausschließlich im Kern bzw. in HSMM-Zellen (Muskelzellen) im Cytoplasma nachweisbar. Die Ursache für das unterschiedlich beschriebene HDAC8-Vorkommen könnte eine Zelltypabhängigkeit sein und eine Gewebe-spezifische Funktion andeuten. Basierend auf phylogenetischen Betrachtungen stellten Gregoretti, Lee und Goodson (2004) die These auf, dass HDAC8 auf Grund seiner Beschränkung auf ein Vorkommen in Vertebraten eine besondere, vermutlich Gewebe-spezifische Funktion einnimmt. Darüber hinaus wiesen sie darauf hin, dass es im Vergleich zu anderen HDAC-Isoformen größere Spezies-übergreifende Sequenzunterschiede gibt.

Die durchgeführte Spezifikation weiterer Zelllinien unterstützte diese Vermutung. So wurde das HDAC8-Protein in K562- sowie in HeLa-Zellen ausschließlich im Cytoplasma, HaCaT, OLN-93 sowie SH-SY5Y hingegen in beiden Kompartimenten detektiert.

Zur Verifizierung der HDAC8-Lokalisation in Hek293-Zellen wurden weitere Methoden zur Lokalisationsbestimmung eingesetzt. Die immunhistochemische Färbung bestätigte ein Vorkommen des nativen HDAC8-Vorkommens in der gesamten Zelle. Dies steht im Gegensatz zu Hu *et al.* (2000) bzw. van den Wyngaert *et al.* (2000), die mit dieser Methode in NIH-3T3-Zellen und in Hek293-Zellen eine rein nukleäre Lokalisation nachwiesen.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit von denen der Literatur abwichen, sich jedoch mit den Untersuchungen der fraktionierten Zellyse deckten, wurde als dritte Methode die HDAC8-Lokalisation in lebenden Zellen mit einem GFP-Fusionsprotein untersucht. Auch dieser

Nachweis zeigte ein HDAC8-Vorkommen in der gesamten Zelle, was die Methode als Ursache für die unterschiedlich beschriebene Lokalisation ausschließt.

Prinzipiell ist die Größe eines Proteins entscheidend für dessen Fähigkeit die Kernmembran zu passieren. Lange *et al.*, (2006) beschrieben die Notwendigkeit einer NLS für den Transport von großen Proteinen wie dem HDAC8-GFP-Fusionsproteins über die Kernmembran, was das physiologische Vorkommen des HDAC8-Proteins im Kern unterstützte.

Die Untersuchungen von Wang und Brattain (2007) beschrieben in diesem Zusammenhang jedoch die passive Diffusion von größeren Proteinen, der bisher postulierten Grenze von 40 kDa [Stewart *et al.*, 2001]. Die Arbeit von Dross *et al.* (2009) mit GFP-Oligomeren wies ebenfalls den Transport von Proteinen mit einem Gewicht größer 40 kDa verlangsamt in den Zellkern nach, obwohl es sich hierbei um kein Kern-assoziiertes Protein handelte. Das bildgebende Verfahren unter Verwendung des schaltbaren Fluoreszenzproteins mEos2 bot hier die Möglichkeit die HDAC8-Lokalisation in lebenden Zellen zeitabhängig zu erfassen und so zur Klärung des Transportmechanismus beizutragen sowie den Lokalisationsnachweis weiter zu verifizieren. Die Lokalisation des HDAC8-Proteins in der gesamten Zelle wurde bestätigt, jedoch konnte bei wenigen Zellen ebenfalls eine Konzentrierung des Fluorophors im Zellkern bzw. im Cytoplasma festgestellt werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten zum ersten Mal auf ein ambivalentes, eventuell reguliertes HDAC8-Lokalisationsverhalten innerhalb einer Zellpopulation hin. So war in Hek293-Zellen der HDAC8-Transport über die Kernmembran in beide Richtungen mit hoher Geschwindigkeit möglich, welcher jedoch im Vergleich zum mEos2-Protein nur beim Transport aus dem Kern signifikant verlangsamt war. Dies bestätigt die Lokalisation in der gesamten Zelle und deutet darüber hinaus auf einen bisher ungeklärten Regulationsmechanismus hin. Dies könnte ebenfalls für die Funktionalität der putativen NLS [Hu *et al.*, 2000] sprechen. Deardorff *et al.* (2012) beschrieben in diesem Zusammenhang die besondere Bedeutung des HDAC8-Proteins in der Pro- und der Anaphase, was ggf. eine Ursache für das unterschiedliche Lokalisationsprofil sein könnte.

Auch die absolute Menge des HDAC8-Proteins deutete auf eine Gewebe-spezifische Funktionalität hin. So wurde die HDAC8-Menge der beiden Zelllinien Hek293 und K562 mit 49,0 ng/mL bzw. signifikant davon abweichend mit 16,5 ng/mL quantifiziert, wobei sich beide Werte jeweils auf 1 mL der zellulären Gesamtproteinmenge bezogen. Untersuchungen von Buggy *et al.* (2000) resultierten ebenfalls in einem sehr divergenten, Gewebetyp-abhängigen Expressionsprofil. Es wurde hier in Leber und Gehirn die höchsten HDAC8-Mengen, in Leukozyten und Muskelgewebe hingegen sehr geringe Mengen nachgewiesen. Auch die beiden Zelllinien K562 sowie HeLa wiesen deutliche Unterschiede auf. Vergleicht man die HDAC8- und HDAC2-Proteinmengen einer Vielzahl an kultivierbaren Zelllinien wies HDAC2

eine gesteigerte Expressionsrate auf [Nakagawa *et al.*, 2007]. Die deutlich höhere HDAC8-Menge in Tumorzellen lässt des Weiteren auf eine onkologische Relevanz schließen [Buggy *et al.*, 2000], obwohl eine HDAC8-Inhibierung ausschließlich bei Jurkat-Zellen (T-Zellen, Mensch) die Apoptose induzierte [Balasubramanian *et al.*, 2008].

Die durchgeführte Charakterisierung der HDAC8-Lokalisation in unterschiedlichen Zelllinien sowie der Literaturvergleich macht die Notwendigkeit einer umfassenden Validierung von Zielmolekülen zum Einsatz als Wirkstoffe deutlich.

5.2 Bindungspartner und Substrate der HDAC8

Die Lokalisationsuntersuchungen dieser Arbeit wiesen stark auf eine HDAC8-Funktion sowohl im Cytoplasma als auch im Kern hin, welche insbesondere aufgrund des divergenten Funktionalitätsprofils in verschiedenen Geweben weiter geklärt werden sollte [Karolczak-Bayatti *et al.* (2011), Waltregny *et al.* (2005), Gao, Siddoway und Huang (2003), Lee *et al.* (2006), Europe-Finner *et al.* (2011), Qian *et al.* (2014), Somoza *et al.* (2004), Olson *et al.* (2009), Yamauchi *et al.* (2011), Van den Wyngaert *et al.* (2000), Willson *et al.* (2010), Deardorff *et al.* (2012), Durst *et al.* (2002), Mu *et al.* (2011), KrennHrubec *et al.* (2007), Balasubramanian *et al.* (2008)]. Hierzu war zunächst die Entwicklung eines Peptid-basierten Chip-Verfahrens in Kooperation mit der Firma PEPperPrint Gegenstand dieser Arbeit. Dieses Verfahren sollte eine einfache, kostengünstige und schnelle Möglichkeit zur weitergehenden Festlegung eines HDAC8-Substratmotivs dienen, aber auch ein erster Schritt zur Substratidentifikation sein. Meyer *et al.* (2007) beschrieben damit zusammenhängend die Möglichkeit gezielt Peptidsequenzen in sehr geringer räumlicher Nähe auf Oberflächen aufzubringen.

Erste Versuche bestätigten die prinzipielle Funktionalität des Testaufbaus durch den selektiven Nachweis der Kontrollen. Zur Verringerung einer unspezifischen Proteinbindung wurden Glaträger mit unterschiedlichen Beschichtungen gewählt, wobei PEGMA/PMMA (10/90) mit einem Verbindungsstück aus 2 β Ala die niedrigste Hintergrundfärbung aufwies und zu einem stabilen Messsignal führte. Damit einhergehend bestätigten Beyer *et al.* (2006) diese dreidimensionale Beschichtung als besonders geeignet Glaträger vor unspezifischen Protein-Adsorptionen zu schützen.

Waren die Kontrollen noch eindeutig, ergab sich für bekannte Sequenzen aus der Acetylomforschung ein divergentes Bild. Es wurde sowohl eine Signalzunahme als auch eine -abnahme detektiert, was im Gegensatz zum Testdesign steht. Die Erhöhung des pH-Wertes könnte in einer erleichterten Deacetylierung des Lysin-Stickstoffes resultieren. Die Variation des pH-Wertes wies jedoch mit zunehmenden pH-Wert eine gesenkte Acetylierungseffizienz auf, sodass die Reaktion weiterhin bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt wurde. Da die hohe Unspezifität ebenfalls auf dem Nachweisprinzip wie bei einer unspezifischen Antikörperassoziation beruhen kann, wurde eine Direktmarkierung mit dem DyLight680 NHS

Ester untersucht. Diese resultierte in einer starken unspezifischen Färbung der gesamten Oberfläche, was sie als Nachweis ausschloss.

Damit einhergehend resultierte die Untersuchung dreier Replikate in einem niedrigen Korrelationskoeffizient, was eine Aussage über die Substratspezifität von HDAC8 gegenüber der Peptidbibliothek ausschließt. Das hohe Hintergrundsignal sowie die mangelnde Reproduzierbarkeit sprachen für die Maskierung des Antikörper-basierten Signals durch die Assoziation des Proteins oder des Antikörpers an die Oberfläche. Dies macht das durchgeführte Prinzip ungeeignet für die Erstellung eines HDAC8-Substrat-Profiles. Weitergehende Untersuchungen insbesondere hinsichtlich der Trägoberfläche oder des Nachweisprinzips könnten hier die Einsetzbarkeit der Methode verbessern.

Da der Nachweis von potentiellen Substraten über den Einsatz einer Peptidbibliothek nicht zielführend war, wurde darauf folgend eine native PAGE zur Isolierung stabiler Komplexe der HDAC8 und potentiellen Bindepartnern eingesetzt. Da die absolute HDAC8-Menge als essentiell angesehen wurde und die Expressionsrate in verschiedenen Zelllinien variierte, war die Wahl eines geeigneten Zellmodells notwendig. Die absolute HDAC8-Menge lag in Hek293-Zellen im Vergleich zu K562-Zellen 3-fach erhöht vor. Aus diesem Grund wurde die Zelllinie Hek293 als Modell nachfolgend eingesetzt. Der Nachweis eines HDAC8-Komplexes aus Hek293-Zelllysate war nicht möglich, wobei das alleinständige HDAC8-Protein ab einer Gesamtproteinmenge von 24,4 µg messbar war. Oftmals handelt es sich bei einer Protein-Protein-Interaktion um einen transienten Zustand, was mit einer niedrigen absoluten intrazellulären Menge einhergeht und so den Nachweis erschwert. Des Weiteren ist es möglich, dass die Bindung an sich schwach ausgeprägt ist. Beide Aspekte könnten den mangelnden Protein-Nachweis in Hek293-Zellen über eine native PAGE erklären.

Die Stabilisierung eines transienten Zustandes kann nach Vidal, Cusick und Barabási (2011) den Nachweis von Proteinkomplexen begünstigen. Der Einsatz des Quervernetzlers Formaldehyd resultierte trotz einer Vielzahl an Variationen zwar im Nachweis von Banden größer des HDAC8-Proteins, jedoch handelte es sich hierbei um Hitze-stabile Verbindungen. Nach Klockenbusch und Kast (2010) ist der Quervernetzungsschritt thermisch reversibel, sodass diese als Artefakte angesehen werden müssen. Der Einsatz von para-Formaldehyd begünstigt den Nachweis von Interaktionen mit weniger engem Kontakt z.B. während der Assoziation oder Dissoziation. Auch hier konnte kein HDAC8-Interaktionspartner identifiziert werden.

Nach Zeng *et al.* (2006) können mit Hilfe von DSS ebenfalls Interaktionen mit größerem Abstand (11,4 Å) vernetzt werden. Damit einhergehend wies die Western Blot-Analyse Banden größer des HDAC8-Proteins in einem mit 1% DSS behandelten Hek293-Zelllysate nach. Die

Immunpräzipitation führte zwar zum HDAC8-Nachweis, weitere Banden und folglich Komplexe konnten jedoch nicht erfasst werden. Dies spricht für einen unspezifischen Nachweis des Antikörpers im Western Blot nach einem Quervernetzungsschritt, da das unbehandelte Lysat diese Banden nicht aufwies.

Die Immunpräzipitation basiert auf dem Erkennen eines Epitops auf der Proteinoberfläche, welches durch die Interaktion mit anderen Proteinen ggf. maskiert werden kann. Als Alternative wurde hier eine Substanz-basierte Präzipitation betrachtet. Untersuchungen der Substanzbibliothek LOPAC resultierten zwar in der Identifikation des potenten Inhibitors P 2742, jedoch wies dieser keine Isoformselektivität auf. Aus diesem Grund wurde die Substanz PCI-34051 [Balasubramanian *et al.*, 2008] in Kooperation mit Matthias Baud (Imperial College, London) synthetisiert und über ein kurzes Verbindungsstück an Sepharose gekoppelt. Die Substanz MB-669 zeigte zwar mit einem IC₅₀-Wert von 134,00±9,16 nM einen erhöhten, allerdings immer noch sehr potenten IC₅₀-Wert gegen das HDAC8-Protein. Es war möglich sowohl rekombinant exprimiertes HDAC8 sowie HDAC8-Protein aus Hek293-Zellen über eine Bindung an die Sepharose/MB-669 zu präzipitieren, was dieses Verfahren als Alternative zur klassischen IP herausstellte. In Hek293-Zellen resultierte sie jedoch nicht im Nachweis von HDAC8-Komplexen sowohl nativer als auch quervernetzter Proben. Die Ergebnisse sprechen insbesondere dafür, dass die absolute Menge der HDAC8-Proteininteraktionen unterhalb der Nachweisgrenze war.

Im Folgenden sollte nun die klassische Co-Präzipitation hinsichtlich der Proteinmenge variiert werden. Hierfür wurde rekombinant exprimiertes HDAC8-Protein in einer IMAC eingesetzt und mit einem Hek293-Zelllysate inkubiert. Dies begünstigte die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion und steigerte die Gesamtmenge.

Eine HDAC8-Aktivität war in den Fraktionen 38 bis 78 nachweisbar, wobei Proteinbanden in einer SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung ausschließlich in den Fraktionen 38 bis 48 detektiert wurden. Der Nachweis von unspezifischen Proteinassoziationen aus dem Zelllysate ebenfalls in einer SDS-PAGE wies eine deutlich geringere Proteinmenge nach. In Kooperation mit Julian Langer (MPI, Frankfurt) wurden in der Fraktion 45 elf potentielle neue HDAC8-Bindepartner identifiziert, wobei darüber hinaus die beiden Interaktionen mit Hsp70 [Lee *et al.*, 2006] sowie mit alpha-Actin [Waltregny *et al.*, 2005] bestätigt werden konnte. Dies spricht insbesondere für die vermutete promiskuitive Funktionalität der HDAC8, welche in einem anpassungsfähigen Aktivzentrum begründet sein kann [Somoza *et al.*, 2004].

Der Komplex aus HDAC8 und H2A / H2B konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Histone H2A, H2B sowie H3 näher betrachtet. Das Histone H4 wurde aus den Untersuchungen ausgeschlossen, da nach Gant *et al.* (2006) H4 kein Substrat

der HDAC8 darstellt. Hierfür wurden unter Verwendung des Systems nach Neumann *et al.* (2008) und in Anlehnung an Porteler und Esteller (2010) die Positionen H2A: K6, K10, H2B: K13, K17, K22, K29, K110 und H3: K5, K10, K15, K19, K24, K37, K57, K80 gewählt und die Proteine mit einer Mono-Acetylierung an der entsprechenden Position exprimiert. Die Positionsbezeichnung gibt die jeweilige Lage der Acetylierung wieder. Die Methode nach Neumann *et al.* (2008) bot im Vergleich zu anderen Verfahren wie der chemischen oder enzymatischen Einführung die Möglichkeit gezielt einzelne Lysine zu acetylieren. Darüber hinaus stellte sie in Hinblick auf die von Gurard-Levin, Kim und Mrksich (2009) beschriebene entscheidende Rolle der distalen Sequenz einen klaren Vorteil gegenüber dem Einsatz von Peptiden dar. In einer SDS-PAGE waren die Histonproteine nachweisbar, was durch den Einsatz des HisTag-Antikörpers im Western Blot bestätigt wurde. Ebenfalls in der Western Blot-Analyse war es darüber hinaus möglich die Acetylierung nachzuweisen.

Eine genaue Aussage des Bindungsereignisses zwischen der HDAC8 und den einzelnen Histonvarianten war durch den niedrigen Reinheitsgrad der Proben erschwert, jedoch konnte eine Tendenz bestimmt werden. Die Konkurrenz des künstlichen Substrates Boc-Lys-(TFA)-AMC sowie den mono-acetylierten Histonvarianten wurde im Aktivitätstest dargestellt. H2A sowie dessen Varianten zeigten keine Bindung, alle Varianten der Histone H2B sowie H3 führten hingegen zur Verdrängung des Substrates. Zur Steigerung der Probenreinheit wurde das Elutionsverfahren auf einen Imidazolgradienten umgestellt, was für die Variante H2BK17 in einer deutlichen Zunahme der Proteinmenge sowie des Reinheitsgrades resultierte. Dies stellt für weitergehende Untersuchungen einen vielversprechenden Ausgangspunkt dar.

In Kooperation mit Daniel Petras (TU Berlin) konnte zur weiteren Verifizierung des Bindungsereignisses die Acetylfunktion der Histone in einer LC/MS-Messung nachgewiesen werden. Eine Abnahme der Acetylierung war für die beiden H2A-Varianten nicht messbar. Folglich stellt H2A nach den vorliegenden Daten sowie den Bindungsuntersuchungen kein HDAC8-Substrat dar. Das H2B-Protein wies ein divergentes Bild auf. Hier wurde eine deutliche Substratspezifität gegenüber der Position H2BK29 aufgezeigt. H3 war mit dieser Methode nicht nachweisbar. Die Untersuchungen des HDAC8-Proteins mit unspezifisch acetylierten Histonen resultierten in einer marginalen Reaktivität [Buggy *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2000; Wyngaert *et al.*, 2000]. Hinsichtlich des H2A-Proteins konnte dies nicht bestätigt werden.

Die genauere Betrachtung der H2BK29-Position wies in der Kristallstruktur 1AOI [Luger *et al.*, 1997] eine freie Zugänglichkeit auf, was sie als HDAC8-Substrat begünstigt. Riester *et al.* (2007) hatten basierend auf einer Untersuchung einer Vielzahl an Ac-X-ZK_(Ac)-Methyl-Coumarinen eine Bevorzugung der Aminosäure Asp an Position -2 gezeigt. Dies ist in Übereinstimmung der H2B-Sequenz mit TQKKDGK²⁹KRRK. Weitere Untersuchungen der -1 sowie +1 Position durch Riester *et al.* (2007) sowie Gurard-Levin, Kim und Mrksich (2009) und die entsprechende Motivfestlegung konnten jedoch nicht bestätigt werden.

Das H2B-Protein ist für die chromosomale Kondensation verantwortlich [de la Barre *et al.*, 2001]. Die Deletion des N-terminalen Bereichs führte darüber hinaus zu einer gesenkten Histon-Bindung an die DNA [Hamiche *et al.*, 2001], wobei dieser Zusammenhang durch Iwasaki *et al.* (2013) bestätigt wurde. Nach Myers *et al.* (2003) stellte die Acetylierung des H2B-Proteins jedoch nur bedingt ein Regulationsmechanismus dar. So fand sie ausschließlich für stark transkribierte Bereiche statt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die HDAC8 insbesondere für die Transkriptionskontrolle von Genen mit hoher Transkriptionsrate eine Rolle spielt. Diese Regulation wurde bisher für andere HDAC-Isoformen beschrieben [de Ruijter *et al.*, 2004]. Folglich ist die HDAC8-Funktion eher additiv zur Deacetylierungsfunktion anderer Vertreter der Klasse I HDACs anzusehen. Über die Position K29 im Speziellen ist noch keine Regulationsfunktion bekannt, was die Interaktion in einen vollkommen neuen physiologischen Kontext setzt. Dieser soll in nachfolgenden Experimenten geklärt werden.

Die große Vielfalt an beschriebenen HDAC8-Interaktionen mit häufiger Gewebespezifität [Karolczak-Bayatti *et al.* (2011), Waltregny *et al.* (2005), Gao, Siddoway und Huang (2003), Lee *et al.* (2006), Europe-Finner *et al.* (2011), Qian *et al.* (2014), Somoza *et al.* (2004), Olson *et al.* (2009), Yamauchi *et al.* (2011), Van den Wyngaert *et al.* (2000), Willson *et al.* (2010), Deardorff *et al.* (2012), Durst *et al.* (2002), Mu *et al.* (2011), KrennHrubec *et al.* (2007), Balasubramanian *et al.* (2008)] konnte hier weiter gefestigt werden. Nicht nur wurden Proteine mit cytoplasmatischer und nukleärer Lokalisation als potentielle Bindepartner identifiziert, sondern die Deacetylierbarkeit einer speziellen Lysinposition des H2B-Proteins gezeigt. Eine Vielzahl der potentiellen HDAC8-Interaktionen wie mit den Proteinen Hsp70, Hsp90 sowie Hop1 [Lee *et al.*, 2006], aber auch mit CREB sowie PP1 [Gao *et al.*, 2003] wurden bisher als reine Bindungsereignisse dargestellt. Die Postulierung anderer Interaktionspartner beruhten auf einer Co-Lokalisation wie bei Hsp20 [Karolczak-Bayatti *et al.*, 2011] oder alpha-Actin [Waltregny *et al.*, 2005]. Ausschließlich für die Proteine SMC3 [Deardorff *et al.*, 2012] sowie ERRalpha [Willson *et al.*, 2010] wurde ein Substratumsatz gezeigt, welche mit der Krebsentstehung [Bernatchez *et al.*, 2013] und dem Cornelia-de-Lange-Syndrom [Willson *et al.*, 2010] in Verbindung stehen. Dies stellt die besondere Bedeutung der Identifikation eines weiteren HDAC8-Substrates heraus.

5.3 Rekombinante Expression des HDAC8-Proteins

Eine ausreichende Proteinmenge mit hoher Reinheit und Konzentration stellte für die Funktionalitätsuntersuchungen dieser Arbeit ein wichtiges Werkzeug dar. Aus diesem Grund war es Ziel ein geeignetes Produktions- und Aufreinigungsverfahren des HDAC8-Proteins zu etablieren. Das rekombinant exprimierte HDAC8-Protein wies mit einer HDAC8-Aktivität von

20-fach über Basal alleinständig eine Deacetylaseaktivität auf, welche mit Untersuchungen von Gantt *et al.* (2006), Hu *et al.* (2000) und Buggy *et al.* (2000) einhergehen. Im Gegensatz dazu sind die anderen Vertreter der Klasse I erst in Proteinkomplexen vollständig aktiv [Hajakawa und Nakayama, 2011].

Zur Etablierung der Aufreinigungsmethode wurde zunächst ein geeignetes Produktionsmediums festgelegt. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied von 2 YT und TB (OD₆₀₀ 4,5 bzw. 4,9) zum LB-Medium (OD₆₀₀ 2,4), sodass von einer mit Broedel, Papciak und Jones (2001) einhergehenden Biomassesteigerung basierend auf dem erhöhten Nährstoffgehalt im Medium ausgegangen werden kann. Die Detektion der HDAC8-Aktivität war hingegen nur gering beeinflusst, da ein Teil des HDAC8-Proteins in Einschlusskörperchen verpackt wurde.

Als nächster Schritt war das Aufreinigungsverfahren Gegenstand der Etablierung. Zur Vermeidung einer Substitution des Kations im Aktivzentrum wurde in Anlehnung an die Arbeit von Fierke *et al.* (2006) zunächst Zink als Komplex-bildendes Ion in einer IMAC eingesetzt, da Nickel-substituiertes HDAC8-Protein eine geringere Aktivität als Zink-substituiertes aufwies. Der Nachweis des HDAC8-Proteins bereits im Durchlauf sprach für eine herabgesetzte Affinität des Zielproteins an das Komplex-bildende Kation.

Nach Heijbel (2003) hängt das Bindeverhalten eines Proteins u.a. von der Wahl des Kations ab. Demnach war die Bindungsstärke für das Maltosebindeprotein-6xHisTag bei Nickel höher, gefolgt von Kobalt und Zink. Darauf aufbauend wurde das Bindeverhalten des HDAC8-Proteins gegenüber weiterer Kationen vergleichend untersucht, woraus sich eine mit Heijbel (2003) einhergehende erhöhte Komplexierung an Kobalt- gefolgt von Nickel-Ionen ergab. Bei Einsatz von Kobalt-Ionen wurde das HDAC8-Protein fast ausschließlich bei einer Imidazolkonzentration von 500 mM eluiert und die Fraktion besaß mit 1,0-fach über Basal eine hohe Aktivität. Eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung wies jedoch ein unzureichendes Trennergebnis nach, welches auch durch weitergehende Untersuchungen nicht verbessert werden konnte. Die Nickel-basierte IMAC führte in der Spitzenfraktion zu einer gesenkten Aktivität von 0,2-fach über Basal. Mit Fierke *et al.* (2006) einhergehend beschrieben Christian Hildmann sowie Daniel Riester in ihren Dissertationen einen Aktivitätsverlust nach einer HDAC8-IMAC mit Nickel-Ionen. Sie führten diese Aktivitätsreduktion auf eine Substitution bzw. einen negativen Einfluss der HDAC8-Interaktion mit dem Säulenmaterial zurück. Die Umstellung auf die Verwendung einer Peristaltikpumpe konnte dieses Problem beheben, da hierdurch die Verweilzeit auf der Säule deutlich reduziert wurde.

Die Probenreinheit nach einem HDAC8-Aufreinigungsverfahren von Hu *et al.* (2000) und Singh *et al.* (2011) lag mit größer 95% deutlich höher als in dieser Arbeit erzielt, sodass nachfolgende adaptive Aufreinigungsschritte untersucht wurden.

Die Trenngüte konnte durch den Einsatz der Ammoniumsulfatfällung bei einer Sättigung von 25% gesteigert werden. Neben der Reduktion der Totalproteinmenge um das 0,57-fache wurde auch die HDAC8-Aktivität um das 0,17-fache gesenkt, sodass von einer Erhöhung der Ammoniumsulfatmenge zunächst abgesehen wurde.

Die Proteinbindung ist nach Bornhorst und Falke (2000) abhängig von der Anzahl der Interaktionsstellen und folglich für einen 6xHisTag im Vergleich zu anderen Wirtsproteinen mit benachbarten Histidinen begünstigt. Geringe Mengen Imidazol führten hier zu einer Verdrängung schwach gebundener Proteine. In dieser Arbeit nahm die Imidazolmenge ebenfalls Einfluss auf die Trennleistung. 25 mM Imidazol im Lysat reduzierte die Bindung des HDAC8-Proteins an das Säulenmaterial, sodass im Durchlauf mit 0,92-fach über Basal eine erhöhte HDAC8-Aktivität vorlag. Der Einsatz von 25 mM Imidazol im Spül- und Äquilrierpuffer resultierte hingegen in keiner nachweisbaren Elution der HDAC8. Eine Konzentration von 40 mM führte nur zu einer 0,26-fachen HDAC8-Aktivität über Basal. Fanden 40 mM Imidazol ausschließlich zum Spülen Einsatz, konnte sowohl der HDAC8-Verlust reduziert als auch die Trenngüte gesteigert werden.

Schuetz *et al.* (2008) beschrieben zur Aufreinigung des HDAC7-Proteins den kombinierten Einsatz einer Nickel-Affinitätschromatographie mit einer Anionenaustauschchromatographie. Für das HDAC8-Protein zeigte dies jedoch keine Steigerung des Reinheitsgrades. Ebenfalls war die Umstellung der Elutionsmethode von einem Imidazolgradienten, zur Elution über eine pH-Wert-Änderung nicht zielführend und resultierte in einer Verschlechterung der Reinheit. Aus diesem Grund wurde die Ammoniumsulfatsättigung während des Fällens auf 40% und der Spülschritt der IMAC nach der Probenaufgabe von 25 auf 50 mL erhöht. Daraus folgte zwar eine Abnahme der HDAC8-Menge insgesamt, jedoch wurde das Ziel einer Reinheit größer als 95% mit einer Menge an HDAC8-Protein von ca. 1,7 mg und einer Konzentration von ca. 1,7 μ M pro 4 L Kulturansatz erreicht.

5.4 Stabilität des HDAC8-Proteins

Im Anschluss an die Etablierung der Proteinaufreinigung stand die Optimierung der Langzeitlagerung im Fokus. Hierzu wurde der Einfluss der Lagerdauer, der Lagertemperatur sowie der Einsatz von Additiven auf HDAC8-Proben unterschiedlicher Reinheit sowie Proteinmenge untersucht.

Die Stabilitätsuntersuchungen über einen Zeitraum von 40 Tagen hatten hier einen deutlichen Aktivitätsverlust nachgewiesen, wobei die Proteinmenge einen signifikanten Einfluss auf die

Proteinstabilität nahm. So sank die HDAC8-Aktivität in den Proben HDAC8-1 (242,0 µg/mL) auf 62% der ursprünglichen Aktivität, während HDAC8-2 und HDAC8-3 (36,0 µg/mL bzw. 128,0 µg/mL) nur noch 7% bzw. 11% ihrer ursprünglichen Aktivität hatten. Im Vergleich wiesen kommerziell erhältliche HDAC8, wie z.B. von BPS-Bioscience, eine deutlich längere Stabilität auf.

Im Folgenden wurde der Einfluss der Additive BSA, Harnstoff, Sucrose sowie PMSF auf die Proteinstabilität untersucht. Das Protein BSA als Füllprotein zur Absättigung der Gefäßwand führte zu keiner vollständigen Langzeitstabilisierung der HDAC8-Aktivität. So war nach 27 Tagen die Aktivität von HDAC8-1 auf 86%, von HDAC8-2 auf 21% und von HDAC8-3 auf 49% bezogen auf die Ausgangaktivität gesenkt.

Im Gegensatz zum beschriebenen positiven Einfluss niedriger Harnstoff-Konzentrationen auf die Stabilität (Fágáin, 1995), waren vier Tage nach der Zugabe nur noch eine marginale HDAC8-Aktivität messbar. Sowohl Sucrose als auch PMSF wiesen keinen signifikanten Einfluss auf die HDAC8-Stabilität der Vereinigungen HDAC8-2 und HDAC8-3 auf. Im Gegensatz hierzu stabilisierte der Einsatz beider Additive das Protein in HDAC8-1. Sucrose führte bei den Proteinen Hämoglobin, Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) sowie Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) ebenfalls zur begünstigten Proteinstabilität, wobei der Effektdurch auf einer Hydratisierung zur Aggregationsinhibierung und auf einer verbesserten der Proteinlöslichkeit beruhte [Gray, 1988; Chi *et al.*, 2003]. PMSF als Proteaseinhibitor verhinderte die proteolytische Degradation. Beide Additive könnten demnach zur Lagerung eingesetzt werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Lagerung stellt die Temperatur dar. Die HDAC8-Aktivitätsuntersuchungen wiesen die starke Temperaturabhängigkeit nach. So wurde im Vergleich zu einer bei 4 °C gelagerten Probe ein Aktivitätsverlust um das 0,63-fache (23 °C) bzw. 0,59-fache (-20 °C) gemessen. Eine Lagerung bei -80 °C resultierte in einer gesteigerten Aktivitätsminderung um das 0,73-fache.

Das Einfrieren der Probe ist jedoch für die Gefriertrocknung unabdingbar. Han *et al.* (2007) beschrieben in diesem Zusammenhang den positiven Effekt von Trehalose und Sucrose auf die Proteinstabilität des humanem Serumalbumins (rHSA) während des Lyophilisierschrittes und folglich dem Einfrierprozess im Allgemeinen. Für das HDAC8-Protein konnte dies jedoch nicht gezeigt werden, was die Methode zur Steigerung der Lagerbarkeit ausschließt.

5.5 Interaktion des HDAC8-Proteins mit kleinen Molekülen

Der Aufbau des Aktivzentrums ist innerhalb der HDAC-Familie hoch konserviert und gliedert sich in eine Eintrittsoberfläche und den angeschlossenen engen Kanal [de Ruijter *et al.*, 2003].

Die HDI lassen sich nach Drummond *et al.* (2005) in sechs Klassen unterteilen. Zu ihnen gehören die kurzkettigen Fettsäuren (Valproinsäure), die Hydroxamsäuren (SAHA, TSA), die zyklischen Tetrapeptide (Trapoxin, Apicidin), Benzamide (MS-275), Epoxyketone (Trapoxin B) sowie Hybridmoleküle (CHAP). Der inhibitorische Effekt verschiedener Substanzklassen divergiert jedoch innerhalb der Familie stark. Die Untersuchungen mit kleinen Molekülen können hier interessante Aspekte hinsichtlich des Bindeverhaltens aufzeigen und zur Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern beitragen.

Im Rahmen der Suche nach potenten HDAC8-Inhibitoren kam das rekombinant exprimierte und aufgereinigte Protein in einem kleinen Screening-Ansatz zum Einsatz. Zur Bestätigung der HDAC8-Funktionalität wurde zunächst der IC₅₀-Wert des unselektiven HDI SAHA mit 383 nM sowie der HDAC8-selektiven Substanz PCI-34051 mit 44 nM im Aktivitätstest bestimmt. Balasubramanian *et al.* (2008) hatten in Übereinstimmung mit den erhobenen Daten für SAHA einen IC₅₀-Wert von 420 nM und für PCI-34051 von 10 nM nachgewiesen. Der aliphatische Rest der Substanz SAHA zeigte zwar im Vergleich zum voluminösen Verbindungsstück der Substanz PCI-34051 eine höhere Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat, jedoch wies HDAC8 eine verringerte Bindung auf. Dies ließ sich auch in der HDAC8-Substrataffinität gegenüber den beiden künstlichen Substraten Boc-Lys(Ac)-AMC sowie Boc-Lys(TFA)-AMC nachweisen. So ist es dem HDAC8-Protein nicht möglich, das Substrat Boc-Lys(Ac)-AMC zu deacetylieren. Der bestehende Test zur Identifikation von Inhibitoren des bakteriellen Homologes HDAH [Haus *et al.*, 2009] wurde für das HDAC8-Protein insbesondere hinsichtlich des Testvolumens angepasst. Eine Untersuchung von 48 Positiv- sowie 48 Negativkontrollen resultierte mit 0,794 in einem hervorragenden Z'-Wert [Zhang, Chung und Oldenburg, 1999]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der inhibitorische Effekt von 1280 pharmakologisch relevanten Substanzen der LOPAC-Bibliothek erfasst. Der Platten-interne Z'-Werte wies mit einem Mittelwert von $0,842 \pm 0,054$ die Screening-Güte und die Aktivität der Positivkontrolle mit 3,3-fach über der Negativkontrolle ein entsprechend gutes Messfenster nach.

Der Schwellenwert für positiv getestete Substanzen wurde auf 50% gesetzt und ergab mit 61 Trefferstrukturen 4,4%. Alle Strukturen konnten wiederbestätigt werden, was eine hervorragende Falsch-Positive-Rate ist. Jedoch quenschten zwölf Substanzen das Fluoreszenzsignal des AMC-Moleküls, wodurch sie folglich aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

Ziel der Untersuchung war es nicht nur potente, sondern aus Isoform-selektive Inhibitoren zu identifizieren. Nur hierdurch ist eine Bestimmung der Struktur-basierten Affinität oder der Einsatz als Werkzeug möglich. Aus diesem Grund wurden die beiden Screening-Kampagnen gegen HDAC8 sowie HDAH [Haus *et al.*, 2009] miteinander verglichen, was im Nachweis der

Substanzen P4509, C-126, D-002, C 8221 und T4443 resultierte, wobei C-126 bereits als Fluoreszenz-löschende Substanz identifiziert wurde. Darüber hinaus wurde die inhibitorische Wirkung der verbleibenden Kandidaten auf das Enzym HDAC4 untersucht. Hier handelt es sich um einen Vertreter der Klasse II und stellt aus diesem Grund ebenfalls einen guten Vergleich dar. Der Einsatz der neun Substanzen C 5913, E 3520, P 2742, S 4063, T 4818, T 7165, T 7540, T 7697 und T 7822 minderten die Enzymaktivität um mindestens 50%. So zeigte die Substanz P 2742 zwar gegenüber der HDAC8 einen IC₅₀-Wert von 0,03 μ M, jedoch ebenfalls potente IC₅₀-Werte gegenüber den meisten anderen HDAC-Isoformen. Die verbleibenden 34 Substanzen wurden im Aktivitätstest eingesetzt und der IC₅₀-Wert bestimmt, wobei dieser von 29 Substanzen unter 35 μ M lag. Darüber hinaus konnte für neun Substanzen ein sehr guter IC₅₀-Wert von kleiner 1 μ M detektiert werden.

Der Vergleich der Substanzen aus Tabelle 4 wies zunächst eine Übereinstimmung in der Form des Verbindungsstückes nach. So wiesen alle Substanzen keine aliphatische Kette entsprechend dem natürlichen Substrat auf, sondern eher ein kurzes und voluminöses Verbindungsstück. Damit einhergehend beschrieben KrennHrubec *et al.* (2007) Verbindungsstück-lose Substanzen als selektive sowie potente HDAC8-Inhibitoren. Ein Abstand zwischen der Zinkbindegruppe zum mit dem Kanal in Interaktion tretendem Bereich wurde hier mit der Länge eines Benzolringes beschrieben (IC₅₀-Wert: 0,3 μ M). Der Austausch mit einer C2-Gruppe führte zu einer Erhöhung des IC₅₀-Wertes auf 0,7 μ M. So war auch bei der Substanz PCI-34051 der Einsatz eines voluminösen Verbindungsstückes mit einem IC₅₀-Wert von 10 nM begünstigt [Balasubramanian *et al.*, 2008].

Im Gegensatz zu anderen potenten HDAC8-Inhibitoren wiesen die Substanzen keine Kopfgruppe auf. Oyelere *et al.* (2011) beschrieben sehr große Kopfgruppen anhand der Untersuchung von makrozyklischen Nanopeptiden als bindungsbegünstigt. Dies wurde ebenfalls durch dynamisches und strukturbasiertes Pharmakophormodelling bestätigt [Thangapandian, John und Lee, 2011]. Dies könnte die deutlich höhere Bindeaffinität der Substanz PCI-34051 erklären. Des Weiteren stellte die Zinkbindedomäne einen wesentlichen Unterschied dar. So verfügte keine der Substanzen über eine Hydroxamat-Gruppe, welche klassische HDAC-Inhibitoren häufig aufweisen. Nach Vaidya *et al.* (2012) war auch eine HDAC8-Inhibierung mit Substanzen ohne eine Zink-Bindefunktion möglich. Diese Substanzen wurden allerdings in einer zweiten Subtasche gebunden und wiesen eine deutlich herabgesetzte Bindeeffizienz auf. Weitergehende Untersuchungen wie die Co-Kristallisation werden hier die Bindungsart definieren.

Grundsätzlich führte die Screening-Kampagne der LOPAC-Bibliothek gegen die HDAC8 zum Nachweis von potenten, jedoch unselektiven HDAC8-Inhibitoren, die nicht als Werkzeuge eingesetzt werden konnten.

Die Substanz P 2742 wies mit einem IC₅₀-Wert von 30 nM die höchste inhibitorische Wirkung gegen das HDAC8-Protein auf. Chamoun-Emanuelli *et al.* (2011) beschrieben die Möglichkeit dieser Substanz HIV anzugreifen, wobei der Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Die Substanz besitzt eine atypische Struktur. Sie weist keine eindeutige Zinkbindedomäne auf. Auch die fehlende Kopfgruppe unterscheidet sie von anderen Vertretern der HDAC8-Inhibitoren. Ausschließlich die voluminöse Form scheint mit anderen Strukturen übereinzustimmen. Neben der Affinität für andere Zielproteine, zeigte sich auch eine mangelnde Isoformselektivität gegen die HDAC-Familie. Dessen ungeachtet stellt sie eine neue Klasse der HDAC8-Inhibitoren dar. Weitergehende Untersuchungen der Strukturwirkungsbeziehung können hier durch gewisse Molekülveränderungen eventuell die Isoformselektivität steigern.

6 Zusammenfassung

Die Lysinacetylierung stellt ein wesentliches, posttranslationales Regulationselement dar, welches von der HDAC-Enzymklasse katalysiert wird. Insbesondere die Transkriptionskontrolle durch Regulation der Histonacetylierung, aber auch weiterer 3600 Acetylierungsstellen, bestätigen die wichtige Rolle dieses epigenetischen Mechanismus. Trotz der intensiven Erforschung des HDAC8-Proteins, konnte seine tatsächliche biologische Funktion nicht vollständig geklärt werden. Ziel dieser Arbeit war es, das ambivalente Bild der Funktionalität sowie der intrazellulären Lokalisation weiter aufzuklären.

Die Erstellung eines Interaktionsprofils diente der näheren Betrachtung der HDAC8-Funktionalität, welche im Nachweis des H2A-H2B-Komplexes und weiterer acht neuer potentieller Bindepartner mit Funktionen im Cytoplasma und im Zellkern. Des Weiteren konnten die bekannten Interaktionen mit Actin und Hsp20 bestätigt werden. Der Nachweis des Proteins in der gesamten Hek293-Zelle und die zeitaufgelöste Darstellung des Transportprozesses über die Kernmembran mit Hilfe des photo-konvertierbaren Fluorophors mEos2 unterstützten die Vermutung einer HDAC8-Funktion in beiden Zellkompartimenten.

Zur Charakterisierung des Bindeverhaltens der HDAC8 mit den Histone H2A, H2B sowie H3 wurden ausgewählte Lysinpositionen spezifisch mono-acetyliert. H2B wurde als Bindepartner bestätigt und eine Präferenz für die acetylierte Position L29 des H2B-Proteins aufgezeigt, was diese als Substrat nachweist. Im Zusammenhang mit der Funktion des Histons H2B in Hinblick auf stark exprimierte Genabschnitte könnte diese Wechselwirkung eine bisher nicht bekannte Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen.

Die Lokalisationsuntersuchung von HDAC8 in verschiedenen Zelllinien trug zur Klärung des mehrdeutigen Funktionalitätsprofils bei. So wurde in K562- sowie in HeLa- Zellen eine hauptsächlich cytoplasmatische, in Hek293, HaCaT, Sh-SY5Y sowie OLN-93 hingegen eine Lokalisation in der gesamten Zelle nachgewiesen. Dies deutet auf eine Zelltyp-abhängige und eventuell Gewebe-spezifische Funktion hin. In Hinblick auf die Entwicklung von gerichteten und potenten Inhibitoren zur gezielten, Gewebe-spezifischen Therapie ist die hier durchgeführte Lokalisationscharakterisierung von besonderem Interesse.

Anhand der LOPAC-Substanzbibliothek konnte zwar keine eindeutige Strukturwirkungsbeziehung abgeleitet werden, jedoch war die Identifikation von potenten HDAC8-Inhibitoren möglich. Insbesondere die Substanz P 2742 stellt aufgrund eines IC₅₀-Wertes von 30 nM trotz einer fehlenden Isoformselektivität einen interessanten Ausgangspunkt für eine weitergehende Wirkstofffindung dar.

7 Abstract

The lysine deacetylation depicts a fundamental, posttranslational regulation mechanism, which is catalyzed by the HDAC family. Especially the histone acetylation regulated transcription control, but also 3600 acetylation sites, highlights the important role of this epigenetic mechanism. Despite the intensive HDAC8 research the biological function is still not completely understood. The aim of this work was to clarify the ambivalent functionality as well as the localization pattern.

Examination HDAC8 functionality concerning the protein interaction profile resulted in the detection of H2A-H2B complex and further eight potential HDAC8 binding partners with cytoplasmic as well as nuclear functions. Moreover Actin and HSP20, known HDAC8 interaction partners, could be proofed. The HDAC8 protein detection in Hek293 cell overall and the transport process development over nuclear membrane using the photo-convertible fluorophor mEos2 supported the assumption of a HDAC8 function in both compartments.

To characterize the HDAC8 binding behavior to the histones H2A, H2B as well as H3, selected lysine positions were mono-acetylated specific. It was possible to confirm H2B as a binding partner and to depict a strong preferation for the position H2BL29 highlighting it as a HDAC8 substrate. Regarding to the H2B function in terms of strong expressed genes this interplay could reveal an unknown transcription regulation element.

The detection of HDAC8 localization pattern in several cell lines clarified the ambivalent functionality profile further. HDAC8 localization was detected in K562 cells as well as HeLa to be cytoplasmia restricted. On the other hand Hek293, HaCaT, Sh-SY5Y and OLN-93 cells displayed an overall localization indicating a cell type eventually tissue specific dependency. Developing potent inhibitor for the selective, tissue-dependent therapy the localization characterization is an interesting aspect.

Studying the inhibitor effect of the LOPAC substance library didn't reveal a distinct structure-activity relationship, but it leads to the identification of potent HDAC8 inhibitors. Especially the substance P 2742 with an IC50 value of 30 nM as a new substance class is an interesting starting point for drug discovery despite the absent of isoform selectivity.

8 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. The transport of molecules between the nucleus and the cytosol. Molecular Biology of the Cell. 4. Edition.

Balasubramanian, S., Ramos, J., Luo, W., Sirisawad, M., Verner, E., Buggy, J.J. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. Leukemia, 22(5):1026-34 (2008)

Bernatchez, G., Giroux, V., Lassalle, T., Carpentier, A., Rivard, N., Carrier, J. The ERRalpha metabolic nuclear receptor controls growth of colon cancer cells. Carcinogenesis (2013)

Beyer, M., Felgenhauer, T., Bischoff, R., Breitling, F., Stadler, V. A novel glass slide-based peptide array support with high functionality resisting non-specific protein adsorption. Biomaterials, Volume 27, Issue 18, Pages 3505–3514 (2006)

Brameier, M., Krings, A., MacCallum, RM. NucPred--predicting nuclear localization of proteins. Bioinformatics. 23(9):1159-60. Epub (2007)

Broedel, S., Papciak, S. Jones, W. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins *in E. coli*. Technical Bulletin Athena Enzyme Systems, Volume 2 (2001)

Buggy, J., Sideris, M., Mak, P., Lorimer, D., McIntosh, B., Clark J. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. Biochem. J. 350, 199±205 (2000)

Bush, E.W., McKinsey, T.A. Protein acetylation in the cardiorenal Axis: The promise of histone deacetylase inhibitors. Circ. Res., 106, 272–284 (2010)

Burgess, R. Refolding solubilized inclusion body proteins. Methods Enzymol., 463:259-82 (2009)

Chamoun-Emanuelli, A.M., Bobhardt, M. Moncla, B., Mankowski, M.K., Ptak, R.G., Gallay, P., Chen, Z. Evaluation of PD 404,182 as an anti-HIV and anti-herpes simplex virus microbicide. Antimicrob Agents Chemother., 58(2):687-97 (2013)

Chelsky, D., Ralph, R., Jonak, G. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol.*, 9:2487–2492. (1989)

Cheung, P., Allis, C.D., Sassone-Corsi, P. Signalling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-271 (2000)

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M., Rehman, M., Walther, T., Olsen, J., Mann, M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 235, 834-840 (2009)

Cole, K., Dowling, D., Boone, M., Phillips, A., Christianson, D. Structural basis of the antiproliferative activity of largazole, a depsipeptide inhibitor of the histone deacetylases. *J Am Chem Soc.*, 133(32):12474-7 (2011)

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.*, 319(5), 1097-1113 (2002)

Deardorff, M., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., Itoh, T., Minamino, M., Saitoh, K., Komata, M., Katou, Y., Clark, D., Cole, K.E., De Baere, E., Decroos, C., Di Donato, N., Ernst, L.J., Francey, S., Gyftodimou, Y., Hirashima, K., Hullings, M., Ishikawa, Y., Jaulin, C., Kaur, M., Kiyono, K., Lombardi, M., Magnaghi-Jaulin, M., Mortier, G., Nozaki, N., Petersen, M.B., Seimiya, H., Siu, V.M., Suzuki, Y., Takagaki, K., Wilde, J.J., Willems, P.J., Prigent, G., Gillesen-Kaesbach, C., Christianson, D.W., Kaiser, F.J., Jackson, L.G., Hirota, T., Krantz, I.D., Shirahige, K. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*, Vol. 489, 313-319 (2012)

de la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A., Dimitrov, S. The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *EMBO J.* 20, 6383–6393 (2001)

Delcuve, G., Khan, D., Davie, J. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics*, 4(1):5 (2012)

de Ruijter, A., van Gennip, H., Caron, H., Kemp, S., van Kuilenburg, A. Histone deacetylase (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 370, 737-749 (2003)

- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R., Richmond, T.J. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571–1573 (2004)
- Dose, A., Liokatis, S., Theillet, F.X., Selenko, P., Schwarzer, D. NMR profiling of histone deacetylase and acetyl-transferase activities in real time. *ACS Chem. Biol.* 6, pp. 419-424 (2011)
- Dowling, D., Gantt, S., Gattis, S., Fierke, C., Christianson, D. Structural studies of human histone deacetylase 8 and its site-specific variants complexed with substrate and inhibitors. *Biochemistry*, 47(51): 13554–13563 (2008)
- Dowling, D., Gattis, S., Fierke, C., Christianson, D. Structures of metal-substituted human histone deacetylase 8 provide mechanistic inferences on biological function. *Biochemistry*, 49(24):5048-56 (2010)
- Dross, N., Spriet, C., Zwerger, M., Müller, G., Waldeck, W., Langowski, J. Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. Volume 4, Issue 4, e5041 (2009)
- Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S.M., Roberts, B., Richardson, W.D. The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *The Journal of Cell Biology*, Volume 107, 841-849 (1988)
- Eberhardter A., Becker, P. Histone acetylation: a switch between repressiv and permissive chromatin. *EMBO reports* vol. 3, No. 3, pp224-229 (2002)
- Egger, G., Gangning, L., Aparicio, A., Jones, P. Epigenetics in human disease and prospect for epigenetic therapy. *Nature*, Vol. 429, 457-63 (2004)
- Ferreira, H., Somers, J., Webster, R., Flaus, A., Owen-Hughes, T. Histone tails and the H3 alphaN helix regulate nucleosome mobility and stability. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4037–4048 (2007)
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Mungenast, A., Tsai, L. H. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, 31, 605–617 (2010)
- Gantt, S., Gattis, S., Fierke C. Catalytic activity and inhibition of human histone deacetylase 8 is dependent on the identity of the active site metal ion. *Biochemistry*, 45 (19), pp 6170–6178 (2006)

Gaoa, H., Siddowaya, B., Huang, Q., Xia, H. Inactivation of CREB mediated gene transcription by HDAC8 bound protein phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 379, Issue 1, Pages 1-5 (2003)

Gurard-Levin, Z.A., Mrksich, M. The activity of HDAC8 depends on local and distal sequences of its peptide substrates. *Biochemistry*, 47(23):6242-50 (2008)

Gurard-Levin, Z.A., Kim, J., Mrksich, M. Combining mass spectrometry and peptide arrays to profile the specificities of histone deacetylases. *Chembiochem.*, 10(13):2159-61 (2009)

Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C. The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays. *J. Biol. Chem.* 280, 33701–33706 (2005)

Gregoret, I., Lee, Y.-M., Goodson, H. Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.*, 338, 17–31 (2004)

Hayakawa, T., Nakayama, J. Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J Biomed Biotechnol.* (2011)

Hamiche, A., Kang, J.G., Dennis, C., Xiao, H., Wu, C. Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14316–14321 (2001)

Hansen, J.C., Tse, C., Wolffe, A.P. Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37, 17637-17641 (1998)

Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.-F., Johanson, K., Sung, C.-M., Liu, R., Winkler, J. Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 20, pp. 15254–15264 (2000)

Imre, G. Anti-apoptotic and pro-inflammatory signaling in cancer cells: status and modulation by chemotherapeutic drugs. *Dissertation* (2007)

Inouea, H., Nojimab, H., Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, Volume 96, Issue 1, Pages 23–28 (1990)

Iwasaki, W., Miya, Y., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tachiwana, H., Shibata, T., Kagawa, W., Kurumizaka H. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio* 3, 363–369 (2013)

Johnston, R.W., Licht J.D. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*. 13-8 (2003)

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, Volume 39, Issue 3, 499-509 (1984)

Kan, P.Y., Lu, X., Hansen, J.C., Hayes, J.J. The H3 tail domain participates in multiple interactions during folding. *Mol Cell Biol.*, 29(2):538-46 (2007)

Karolczak-Bayatti, M., Sweeney, M., Robson S.C., Ullrich, M., Taggart, J., Europe-Finner, N.G. Inhibition of HDAC8 and acetylation of Hsp20 regulates contractile activity of human myometrial smooth muscle. *Proc Physiol Soc*, 23, C82 (2011)

Kim, J.A., Hsu, J.Y., Smith, M.M., Allis, C.D. Mutagenesis of pairwise combinations of histone amino-terminal tails reveals functional redundancy in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5779–5784. (2012)

Klockenbuch, C., Kast, J. Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *J Biomed Biotechnol.*, 927585 (2010)

Kornberg, R., Lorch, Y. Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 563-87 (1992)

Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., Yao, T.P. HDAC6 regulates HSP90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptors. *Moll Cell*, 18(5):601-7 (2005)

KrennHrubec, K., Marshall, B., Hedglin, M., Verdin, E., Ulrich, M. Design and evaluation of „linkerless“ hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters* (17), 2874-2878 (2007)

Lange, A., Mills, R., Lange, C., Stewart, M., Devine, S., Corbett, A. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with Importin α . *J Biol Chem.*, 282(8):5101-5. Epub (2006)

Makkerh, J.P., Dingwall, C., Laskey, R.A.: Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. In: *Curr Biol.* 6, Nr. 8, 1025–7 (1996)

Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 °Å resolution. *Nature* 389, 251–260 (1997)

Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 °Å resolution. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113 (2002)

McGinty, R.K., Kim, J., Chatterjee, C., Roeder, R.G., Muir T.W. Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. *Nature.* 453:812–816 (2008)

Myers, F., Chong, W., Evans, D., Thorne, A., Crane-Robinson, C. Acetylation of histone H2B mirrors that of H4 and H3 at the chicken β -globin locus but not at housekeeping genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 36315-36322 (2003)

Nakai, K., Horton, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.*, 24(1):34-6. (1999)

Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M., Tsuneyoshi, M. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep.*, 18(4):769-74 (2007)

Neumann, H., Peak-Chew, S.Y., Chin J.W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol.*, 4(4), 232-4 (2008)

Nobeli, I., Favia, A.D., Thornton, J.M. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nat Biotechnol.*, 27(2):157-67 (2009)

Oehme, I., Deubzer, H.E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J.-P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S., von Deimling, A., Fischer, M. und Witt, O. Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investing Drugs*, 18(11):1605-17 (2009)

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* 25:1605-1612 (2004)

Phillips, T., Shaw, K. Chromatin remodeling in eukaryotes. *Nature Education* 1(1):209 (2008)

Portela, A., Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.*, 28(10):1057-68 (2010)

Qian, Y., Zhang, J., Jung, Y., Chen, X. DEC1 Coordinates with HDAC8 to Differentially Regulate TAp73 and Δ Np73 Expression. *PLOS one* (2014)

Riester, D. Entwicklung von Substraten und Inhibitoren pharmakologisch relevanter Proteintargets. Dissertation (2004)

Riester, D., Hildmann, C., Grünewald, S., Beckers, A., Schwienhorst, A. Factors affecting the substrate specificity of histone deacetylases. *Biochem Biophys Res Commun.*, 357(2):439-45 (2007)

Sanchez, C., Lachaize, C., Janody, F., Bellon, F., Röder, L., Euzenat, J., Rechenmann, F., Jacq, B. Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet Database. *Nucleic Acid Res.*, 27(1):89-94 (1999)

Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M. M., Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research* 17: 6419 (1989)

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R. und Peterson, C.L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762):844-7 (2006)

Shiio, Y., Eisenman, R.N. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 13225-13230 (2003)

Somoza, J., Skene, R., Katz, B., Mol, C., Ho, J., Jennings, A., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.-C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E., Dougan, D., Snell, G., Navre, M., Knuth, M., Swanson, R., McRee, D., Tari, L. Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure*, Volume 12, Issue 7, 1325–1334 (2004)

Sperling, A.S., Grunstein, M. Histone H3 N-terminus regulates higher order structure of yeast heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13153–13159 (2009)

Sorokin, A.V., Kim, E.R., Ovchinnikov, L.P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)*, 72(13):1439-57 (2007)

Thangapandian, S., John, S., Lee K.W. Dynamic structure-based pharmacore model development: a new and effective addition in the histone deacetylase 8 (HDAC8) inhibitor discovery. *Int J Mol Sci.*, 12(2):9440-62 (2011)

Thorne, A.W., Kmiecik, D., Mitchelson, K., Sautiere, P., Crane-Robinson, C. Patterns of histone acetylation. *Eur. J. Biochem.* 193, 701-713 (1990)

Vaidya, A.S., Neelarapu, R., Madriaga, A., Bai, H., Mendonca, E., Abdelkarim, H., van Breemen, R.B., Blond, S., Petukhov, P.A. Novel histone deacetylase 8 ligands without a zinc chelating group: Exploring an 'upside-down' binding pose. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 6621–6627 (2012)

Van den Wyngaert, I., de Vriesa, W., Kremera, A., Neefsb, J.-M., Verhasselc, P., Luytena, W., Kassa, S. Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Letters*, Volume 478, Issues 1–2, 77–83 (2000)

Van Lint, C., Emiliani, S., Verdin, E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245-253 (1996)

Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkühler, C., Di Marco, S. Crystal structure

of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(42):15064-9. Epub (2004)

Vidal, M., Cusick, M., Barabási, A.-L. Interactome networks and human disease. *Cell*, Volume 144, Issue 6 (2011)

Villagra, A., Sotomayor, E.M., Seto, E. Histone Deacetylases and the immunological network: Implications in cancer and inflammation. *Oncogene*, 29, 157–173 (2010)

Waltregny, D., North, B., Van Mellaert, F., de Leval, J., Verdin, E., Castronovo, V. Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells. *Eur J Histochem.*, 48(3):273-90 (2004)

Waltregny, D., Glénisson, W., Tran, S., North, B., Verdin, E., Colige, A., Castronovo, V. Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle α -actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB*, online veröffentlicht (2005)

Wegener, D., Hildmann, C., Riester, D., Schwienhorst, A. Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications. *Anal. Biochem.* 321, 202–208 (2003)

Wegener, D. Entwicklung eines HTS-geeigneten Enzymtests für Histondeacetylasen zur Entwicklung von HDAC-Inhibitoren. Dissertation (2004)

Whitehead, L., Dobler, M.R., Radetich, B., Zhu, Y., Atadja, P.W., Claiborne, T., Grob, J.E., McRiner, A., Pancost, M.R., Patnaik, A., Shao, W., Shultz, M., Tichkule, R., Tommasi, R.A., Vash, B., Wang, P., Stams, T. Human HDAC isoform selectivity achieved via exploitation of the acetate release channel with structurally unique small molecule inhibitors. *Bioorg Med Chem.*, 19(15):4626-34, Epub (2011)

Wilson, B., Tremblay, A., Deblois, G., Sylvain-Drolet, G., Giguère V. An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor. *Mol Endocrinol*, 24(7):1349–1358 (2010)

Wingfield, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci.* (2001)

Wolfson, N.A., Pitcairn, C.A., Fierke, C.A. HDAC8 substrates: Histones and beyond. *Biopolymers.*, 99(2):112-26 (2013)

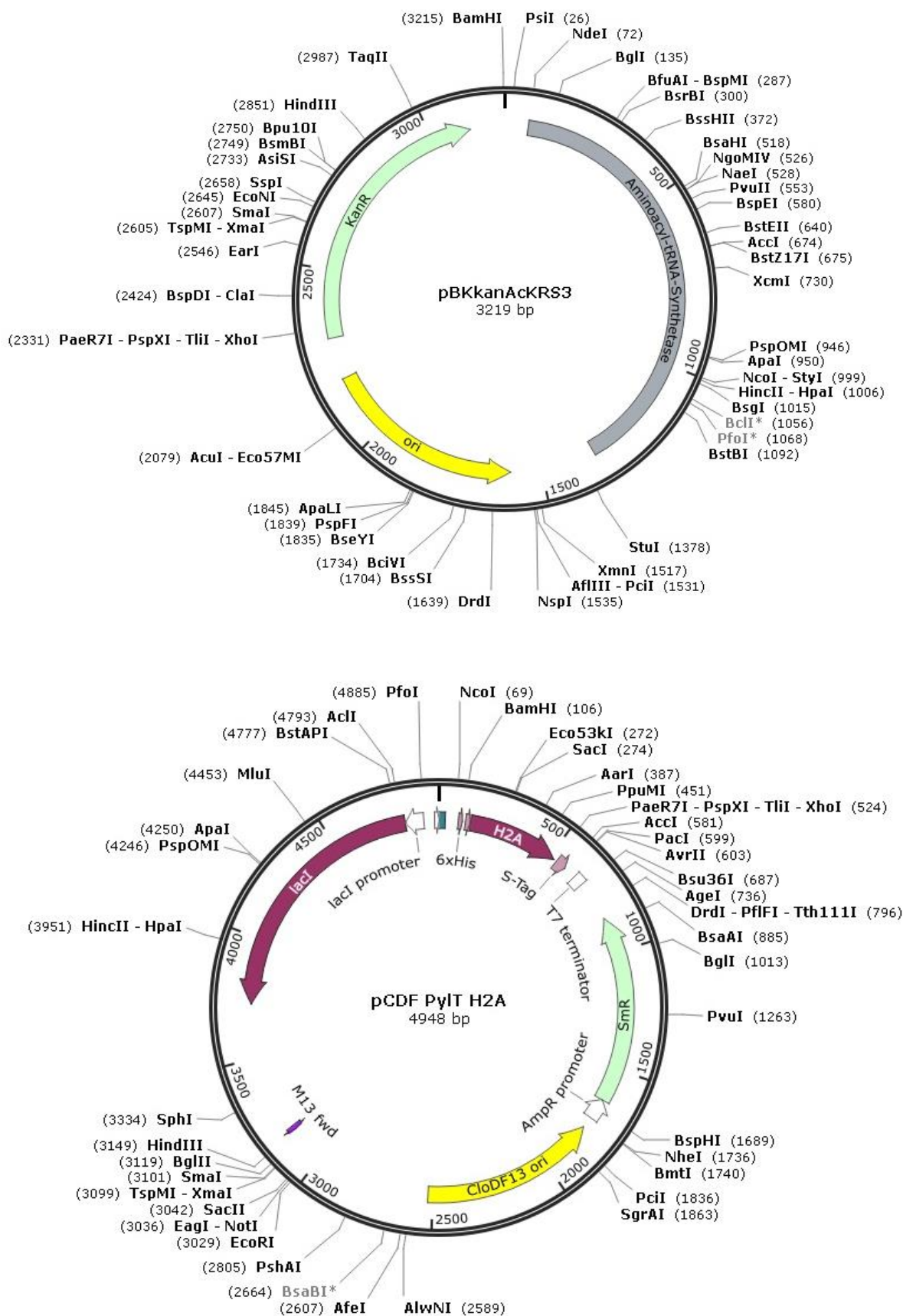
Wu, R., Wang, S., Zhou, N., Cao, Z., Zhang, Y. A Proton-shuttle reaction mechanism for histone deacetylase 8 and the catalytic role of metal ions. *J Am Chem Soc.*, 132(27): 9471–9479 (2010)

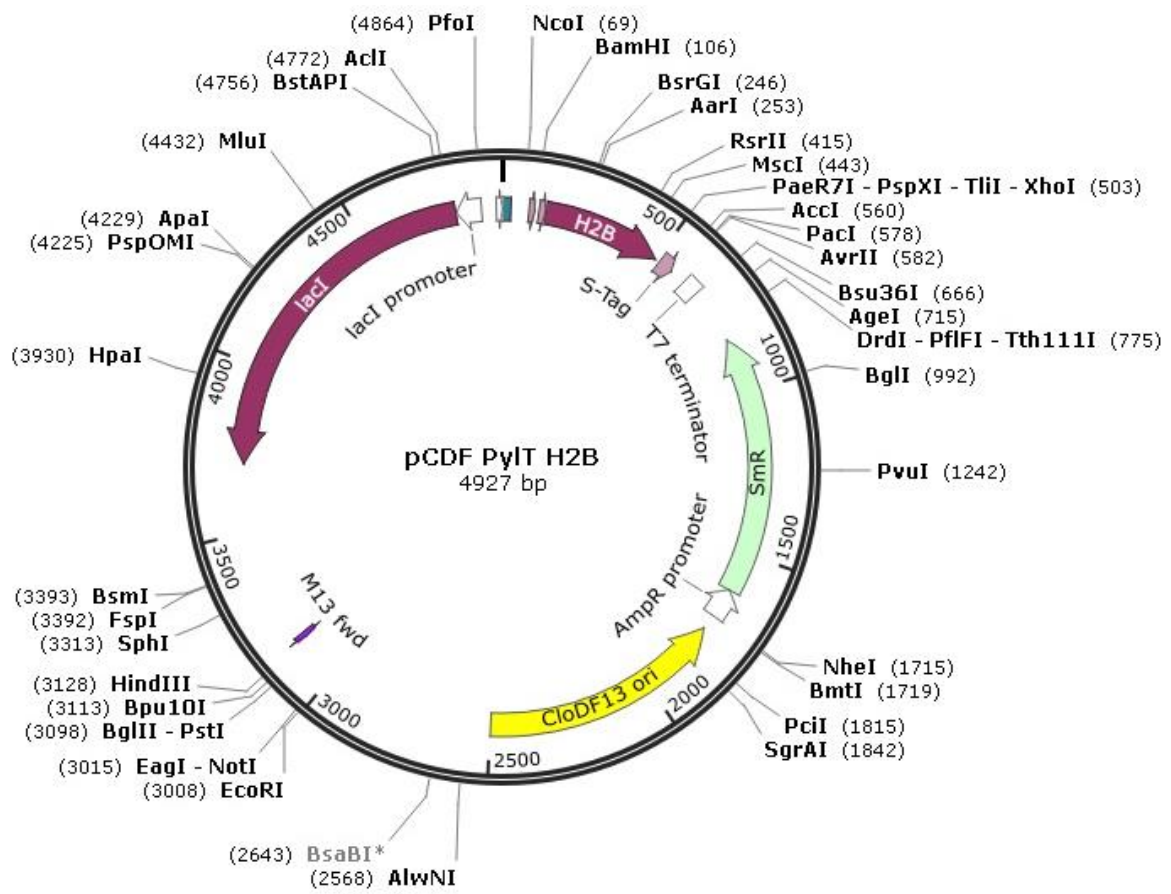
Joung, J. K., Ramm, E. I., Pabo C. O. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7382–7387. (2000)

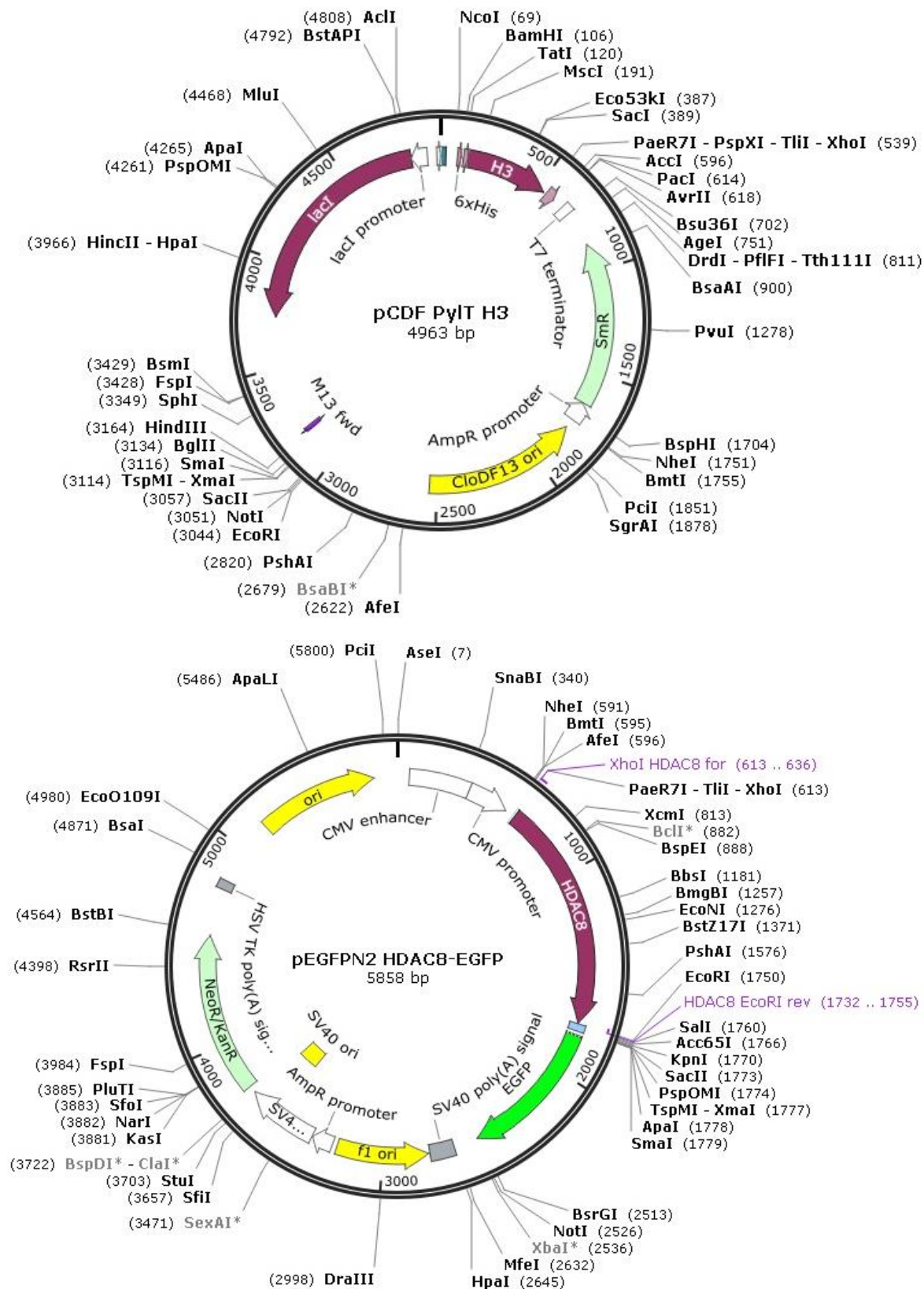
Zhang, J.H., Chung, T.D.Y., Oldenburg, K.R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening* 4: 67–73 (1999)

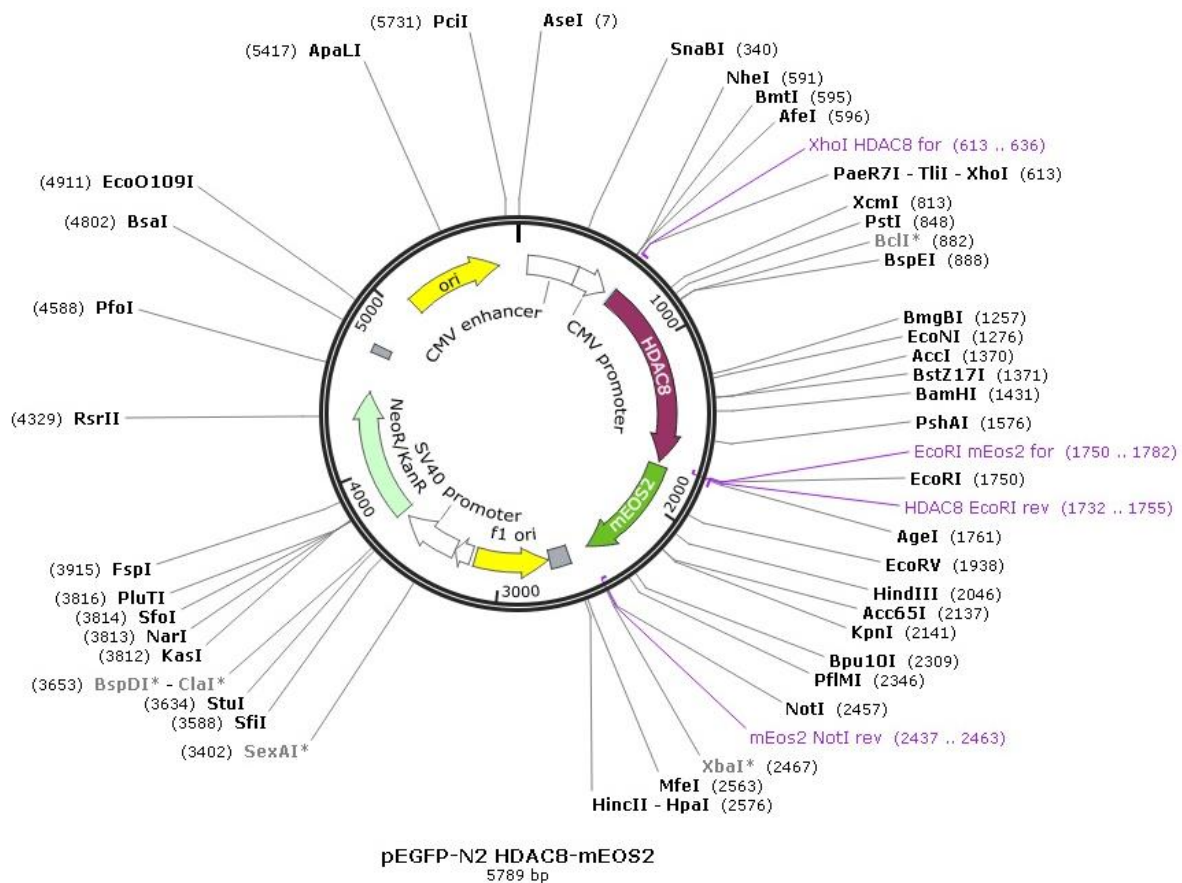
Zhao, Y., Lu, S., Wu, L., Chai, G., Wang, H., Chen, Y., Sun, J., Yu, Y., Zhaou, W., Zheng, Q., Wu, M., Otterson, G.A., Zhu, W.G. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21 (Waf1/Chip1). *Mol Cell Biol.*, 26(7):2782-90 (2006)

9 Anhang









10 Lebenslauf

04/2010 - 2014	Doktorarbeit „Histondeacetylase 8: Interaktionen und Lokalisation“ Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Meyer-Almes, Hochschule Darmstadt und Prof. Dr. Gerhard Thiel, Technische Universität Darmstadt
11/2009 - 03/2010	Research Scientist Micromet AG, München, Nonclinical Pharmacology/ Oncology
09/2009	Abschluss „Dipl. Ing. Biotechnologie (FH)“
03/2009 - 09/2009	Diplomarbeit „Charakterisierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes in Insulin-sensitiven Systemen“ Betreuer: Dr. Norbert Tennagels, Sanofi-Aventis GmbH
01/2008 - 12/2008	Wissenschaftliche Hilfskraft , Screening (HDAH) Hochschule Darmstadt
10/2005 - 09/2009	Studium der Biotechnologie Hochschule Darmstadt
03/2004 - 06/2005	Fachhochschulreife Kollegtagschule, Ludwigshafen
09/2003 - 08/2004	Biologielaborantin Altana Pharma AG, Konstanz, Pharmakologie/ Onkologie
02/2003 - 08/2003	Biologielaborantin Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Inprozesskontrolle unter GLP-Bedingungen
09/1999 - 01/2003	Ausbildung zur Biologielaborantin Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
09/1998 – 07/1999	Heinrich-Böll-Gymnasium
09/1992 - 07/1998	Kopernikus-Realschule, Ludwigshafen
09/1988 - 07/1992	Rupprecht-Grundschule, Ludwigshafen